

UNIVERISTA' DEGLI STUDI DI MILANO



Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche cliniche e Sperimentali

Dipartimento di Scienze della Salute

Corso di Dottorato in "MALATTIE INFETTIVE" Ciclo XXVII

***FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA VIROLOGICA
SOSTENUTA IN PAZIENTI CON COINFEZIONE HIV-HCV
TRATTATI CON PEG-INTERFERONE E RIBAVIRINA***

Tutor: Dr.ssa Giulia Carla MARCHETTI

Coordinatore: Prof.ssa Antonella D'ARMINIO MONFORTE

Tesi di Dottorato di Ricerca:

Dr.ssa Alessia UGLIETTI

Matricola R09736

Anno Accademico 2013-2014

.....Alle cose semplici ma preziose della vita

INDICE

Abbreviazioni	4
Abstract	5
Introduzione	7
- Coinfezione HIV-HCV	10
- Immunoattivazione	14
- Traslocazione microbica	16
- Componente immunitaria T CD4+	18
- <i>Immunological non responder</i>	20
- Trattamento anti-HCV e risposta terapeutica	22
Obiettivi	25
Materiali e Metodi	26
- Obiettivo 1a	26
- Obiettivo 1b	28
- Obiettivo 2	31
Risultati	32
- Obiettivo 1a	32
- Obiettivo 1b	46
- Obiettivo 2	49
Discussione	55
- Obiettivo 1a	55
- Obiettivo 1b	60
- Obiettivo 2	61
Conclusione	64
Bibliografia	65

ABBREVIAZIONI

HCV= virus epatite C
HBV= virus epatite B
MSM= uomini che hanno rapporti sessuali con uomini
WHO= Organizzazione Mondiale della Sanità
DAA= farmaci ad azione diretta antivirale
HIV= virus dell'immunodeficienza umana
ESLD= malattia epatica di stadio terminale
HAART= terapia antiretrovirale altamente attiva
ALT= alanina aminotransferasi
AST= aspartato aminotransferasi
NRTI= inibitori nucleosidici di trascrittasi inversa
PI= inibitori della proteasi
IA=immunoattivazione
PegIFN- α = peginterferone α 2a/2b
TM= traslocazione microbica
LPS= lipopolisaccaride
SCD14= CD14 solubile
MVC= maraviroc
RBV= ribavirina
BMI= body mass index
RVR= risposta virologica rapida
EVR=risposta virologica precoce
EOT= fine trattamento
SVR= risposta virologica sostenuta
HOMA= indice di valutazione del modello omeostatico
WSM donne che hanno rapporti sessuali con uomini
TDF= tenofovir
FTC= emtricitabina
3TC= lamivudina
ATV/r= atazanavir/ritonavir
DRV/r= darunavir/ritonavir
ISG= gene IFN-stimolato

ABSTRACT

L'epatite C è un'infezione causata dal virus HCV che nella maggior parte dei pazienti cronicizza fino a condurre a cirrosi epatica, disfunzione d'organo e tumore del fegato. Circa il 30% dei pazienti HIV positivi sono anche HCV-positivi. La terapia fino a pochi mesi fa considerata lo *standard of care* per HCV nei pazienti coinfecti era peg-interferone più ribavirina per 48 settimane. L'eradicazione veniva ottenuta tra il 20-55% casi sebbene con effetti collaterali importanti. In aggiunta si è cercato di determinare i fattori dipendenti dall'ospite capaci di modificare la risposta al trattamento e di classificare subito i pazienti.

Lo scopo di questa tesi è stato identificare i marker e le condizioni predittivi per il successo terapeutico in corso di terapia anti-HCV in pazienti coinfecti HIV-HCV. I marker considerati sono stati fattori correlati alla traslocazione microbica come sCD14 e LPS, i fattori di immunoattivazione CD8+CD38+, il rapporto CD4+/CD8+, e l'induzione con un farmaco antiretrovirale, maraviroc.

Si è visto come gradi più severi di malattia epatica sia correlati con un trend in incremento di sCD14 e che questo fattore sia il principale predittore di EVR.

Inoltre in corso di terapia anti-HCV ci sia un incremento di immunoattivazione, considerando il parametro CD8+CD38+, e che questo sia fattore fondamentale per l'outcome al trattamento soprattutto nelle prime fasi di terapia.

Per concludere si è valutato come l'intensificazione della terapia HAART con maraviroc abbia condizionato un miglioramento dell'immunità cellulo-mediata e permesso di affrontare il trattamento anti-HCV a pazienti *immunological non responder*.

INTRODUZIONE

L'infiammazione del fegato, nota come epatite, determina una serie di sintomi diversi, alcuni anche molto gravi, come ittero, nausea, astenia, prurito, malessere, e alla fine alterazioni anche gravi della funzione epatica [1]. L'infiammazione epatica potrebbe essere causata da disordini metabolici, tossine, batteri, alcool, farmaci ma le infezioni virali sono la causa predominante. Molti virus, citomegalovirus, virus di Epstein-Barr ed herpes simplex sono associati a epatiti fugaci e solitamente lievi durante un'infezione acuta. I virus che principalmente o esclusivamente hanno come bersaglio il fegato sono i virus epatici di sei principali gruppi (denominati da A a E) [2]. La classificazione e la struttura di questi virus differisce in modo significativo tra di loro. Il virus dell'epatite C (HCV) appartiene alla famiglia delle *Flaviviridae*, come anche il virus della malattia di Dengue e della febbre gialla. Questi virus sono strutturalmente simili e contengono un singolo filamento di RNA circondato da un doppio strato lipidico protettivo. La famiglia delle *Flaviviridae* è divisa in tre generi, *Flavivirus*, *Pestivirus*, e *Hepacivirus* dove è incluso HCV [3].

La principale via di trasmissione per HCV è attraverso l'esposizione parenterale a sangue infetto. Nei paesi in via di sviluppo l'infezione da HCV è per lo più a diffusione nosocomiale, per via trasfusionale con screening inadeguati dei prodotti ematici o per utilizzo di materiale medico non adeguatamente sterilizzato. Nei paesi sviluppati la principale fonte di infezione sono la condivisione di aghi infetti tra tossicodipendenti ma

potrebbero verificarsi anche trasmissioni nosocomiali per esposizione di aghi infetti o materiale contaminato [4]. Negli ultimi anni sono incrementati i casi di esposizione sessuale, per la maggior parte in rapporti sessuali tra *men who have sex with men* (MSM), che hanno portato a un ulteriore incremento dei casi di persone HCV-positive e possibili reinfezioni anche dopo trattamenti eradicanti [5].

I primi 6 mesi post-infezione comprendono la fase acuta dell'epatite C che può essere silente o paucisintomatica. Durante questa fase, circa il 20% dei soggetti infetti guarisce spontaneamente eliminando il virus. Comunque, la maggior parte dei pazienti evolve a stadio di epatite cronica, definita come HCVRNA rilevabile nel sangue dopo 6 mesi dall'infezione [6], e spesso può diventare infezione a lungo termine se non trattata. L'infezione da HCV cronica causa frequentemente fibrosi epatica, cioè deposizione anormale di tessuto connettivo nel fegato, che altera le normali funzioni d'organo. Lo stadio finale della fibrosi che rimpiazza la normale architettura epatica con tessuto cicatriziale e noduli di rigenerazione, è chiamato cirrosi e può condurre a morte. Circa il 20% dei pazienti cronici sviluppano cirrosi dopo 20 anni dall'infezione [7]. I pazienti HCV-positivi in stadio cirrotico sono ad alto rischio di sviluppo di carcinoma epatocellulare (HCC), che conduce al decesso questi pazienti [6,8,9], oltre all'insufficienza epatica. Lo stadio finale di insufficienza epatica è la principale indicazione al trapianto di fegato.

Prima della scoperta di HCV nel 1989, l'epatite causata da questo virus veniva chiamata epatite non-A e non-B [10] – soprattutto riscontrata nei tossicodipendenti e nei soggetti sottoposti a trasfusioni di prodotti ematici. Perciò identificare i soggetti infetti è diventato un problema di salute pubblica.

Nel 2014 è stato stimato l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) stimava circa 185 milioni di persone infette cronicamente da HCV [11].

A seguito delle diversità della sequenza nucleotidica di HCV, il virus è suddiviso in sette genotipi, dall'1 al 7 [12] e altri sottotipi denominati con lettere a,b,c *etc.* Fra i differenti genotipi, la diversità a livello nucleotidico è stimata essere circa 30% e circa 20-25% fra i sottotipi [13]. Fra gli individui infetti le particelle di HCV di differenti genotipi variano lievemente, dovuto alla capacità mutante di HCV stesso [14]. Queste variazioni intra-ospite sono denominate quasispecie, riferendosi a multiple variazioni di sequenze HCV prodotte ogni giorno in ciascun paziente. Questa eterogena popolazione virale potrebbe rapidamente selezionare cloni resistenti al trattamento così da ridurre l'efficacia della terapia soprattutto nei confronti dei nuovi farmaci ad azione diretta antivirale (DAA) recentemente approvati [15].

La distribuzione geografica dei diversi genotipi è abbastanza distinta, dove i genotipi 1,2, e 3 presentano una distribuzione mondiale con una più alta prevalenza in Europa, Nord e Sud America, e Giappone. HCV genotipo 3 viene anche riscontrato nel Sud-Est Asiatico, India, e Australia, mentre il genotipo 4 è prevalente in Africa e nel Medio Oriente [16].

In Italia il genotipo prevalente è l'1 in circa 60% dei soggetti con HCV – la maggioranza genotipo 1b-, a seguire il genotipo 2 (28%), 3 (9%) e 4 (4%). Le percentuali possono variare nelle diverse aree geografiche italiane dove si possono riscontrare punti in percentuale maggiori o minori ma sono variazioni che non cambiano l'assetto principale [17,18].

Coinfezione HIV-HCV

Ad aggiungere maggiori problematiche al decorso della malattia da HCV e alla risposta terapeutica vi è la coinfezione con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV). L'HIV e l'HCV seguono le stesse vie di trasmissione.

La prevalenza della coinfezione da HCV varia in base alle modalità di trasmissione della malattia HIV. La modalità di trasmissione più efficace è l'esposizione percutanea a sangue, con trasmissione di 10 volte più alta per HCV rispetto HIV. Ovviamente tra i pazienti HIV la modalità di trasmissione più frequente rimane l'abuso di droghe per via endovenosa [19,20], in netto incremento però i comportamenti sessuali degli MSM [21,22].

Dopo un'infezione acuta da HCV, la progressione a malattia cronica HCV-correlata è di circa il 70-85% in pazienti non HIV-positivi e più del 90% in soggetti affetti da HIV, in particolar modo quelli con immunosoppressione avanzata [23,24] con un peggioramento della prognosi fino alla fase terminale di malattia epatica (*end-stage liver disease* –ESLD) e allo sviluppo di HCC con un alto impatto su mortalità e morbidità. Ciò dovuto anche all'allungamento dell'aspettativa di vita di un soggetto HIV-positivo grazie all'introduzione del trattamento antiretrovirale altamente attivo (HAART), come valutato in grandi coorti di individui coinfecti HIV-HCV in paesi occidentali [25-27]. Inoltre, una meta-analisi di otto studi ha valutato il rischio di cirrosi e ESLD in soggetti coinfecti HIV-HCV rispetto ai monoinfecti HCV. Gli autori hanno evidenziato, un rischio di progressione a cirrosi ed insufficienza epatica di 2 e 6 volte, rispettivamente [28].

Il rischio di carcinoma epatocellulare in pazienti coinfecti, invece, sia pari a 1-4% per anno dallo sviluppo della cirrosi [29]. Si è visto come, nei pazienti

HIV-positivi, l'epatite C sia caratterizzata da un'accelerata progressione della patologia epatica virus-correlata. Dall'analisi di una coorte statunitense di pazienti emofilici è stato osservato come l'insufficienza epatica si sviluppasse nel 9% dei pazienti multitrasfusi coinfecti HIV-HCV, privi di infezioni opportunistiche AIDS-definienti [30].

Inoltre, è stato mostrato come i pazienti coinfecti HIV-HCV abbiano livelli più alti di HCV RNA plasmatico [31,32], e, in alcuni studi, livelli elevati di HCV RNA sono stati correlati con un'immunosoppressione più avanzata [33].

Molti studi hanno confermato il decorso sfavorevole dell'epatite C nei pazienti emofilici HIV-positivi, in particolare nel caso di progressione dell'immunodeficienza e di conta di linfociti T CD4+ inferiore a 100/μL [34]. A questo proposito, si sottolinea come il declino dell'immunità cellulo-mediata associata all'avanzare dell'infezione da HIV possa favorire una maggiore replicazione del virus HCV e, di conseguenza, un aumento della gravità dell'infezione e del danno a carico degli epatociti, sebbene sia stata provata una scarsa correlazione tra la carica virale di HCV e la gravità del danno epatico. Nei pazienti coinfecti, inoltre, la risposta delle cellule immunitarie al virus dell'epatite C è probabilmente più debole. L'infezione HIV-HCV delle cellule CD3+/CD30+ altera la produzione di citochine, distorta attraverso una risposta antinfiammatoria Th2 anziché la risposta protettiva Th1 osservata quando le cellule sono colpite dal solo virus HCV [35].

A sottolineare il maggior tasso di morbidità dei soggetti coinfecti HIV-HCV rispetto agli HCV-positivi si enunciano i risultati dello studio MACS (Multicenter AIDS Cohort Study) [36], dove su 5293 soggetti osservati, i pazienti coinfecti avevano una probabilità di morire per patologia epatica 19

volte superiore rispetto a quelli con sola epatite B e 8 volte maggiore rispetto ai soli HIV-positivi. E' emerso, inoltre, che questo elevato tasso di mortalità attribuito a patologia epatica era più elevato tra i soggetti con un *nadir* di linfociti T CD4+ inferiore a 100 cellule/ μ L e tra coloro che abusavano di alcolici.

I fattori di rischio per la progressione di malattia epatica in soggetti coinfecti HIV-HCV comprendono un consumo di alcool elevato, un'età di acquisizione di HCV maggiore (>25 anni), e una condizione di malattia HIV più avanzata (linfociti T CD4+ <200-250 cell/ μ L) [37,38]. Altri fattori che potrebbero incidere in senso negativo sono la variabilità del genotipo HCV [39], l'infezione occulta da HBV [40], e l'epatotossicità correlata alla terapia antiretrovirale [41]. Fra il 10% degli individui coinfecti HIV-HCV con transaminasi normali [42], una parte (fino al 30%) potrebbe avere una fibrosi epatica significativa dimostrata all'epatobiopsia. Così che, un normale valore di alanina aminotransferasi (ALT) in soggetti coinfecti HIV-HCV non esclude una possibile progressione di fibrosi epatica.

Una volta che gli individui coinfecti HIV-HCV hanno sviluppato un quadro di cirrosi, il rischio di scompenso epatico è più alto rispetto agli HCV-positivi e il tasso di sopravvivenza successivo è scarso nonostante una HAART efficace. Perciò, la malattia epatica è una causa che porta a morte i soggetti coinfecti HIV-HCV nei paesi con più alto tasso di coinfezione [26,43,44] anche individui con linfociti T CD4+ > 200 cellule/ μ L [45]. Anche il rischio di HCC è maggiore fra gli individui coinfecti HIV-HCV con cirrosi, ed è associato con una durata più breve di infezione HCV, età media più giovane alla diagnosi

(casi in individui di quaranta anni non sono infrequenti), e decorso clinico più aggressivo rispetto agli HCV-positivi [46,47].

Sono comparsi anche studi che hanno preso in esame l'impatto della HAART sulla morbilità e sulla mortalità di soggetti coinfecti HIV-HCV e sottolineando un effetto protettivo sulla progressione della fibrosi [48-50]. Mentre i meccanismi di questa relazione siano ancora poco chiari, una viremia HIV non controllata e un'immunodepressione importante potrebbero essere associate una progressione accelerata di malattia epatica. L'impatto positivo della HAART sulla malattia epatica potrebbe indicare come favorevole l'introduzione precoce della terapia suddetta nei soggetti positivi HIV-HCV. D'altro canto, la HAART può aumentare il danno epatico in alcuni individui coinfecti per l'epatotossicità farmaco-correlata [51-53]. La maggior parte degli eventi di epatotossicità lieve-moderata sono asintomatici, di breve durata, e gestibili con cambiamento dei farmaci [53,54] o con un periodo di sospensione del trattamento. Inoltre, alcuni farmaci antiretrovirali (in particolar modo i vecchi inibitori di transcriptasi inversa – NRTI – come didanosina e zidovudina) sono stati associati a un danno mitocondriale, sindrome metabolica, e steatosi o fibrosi epatica [55], ma oggi non vengono più prescritti in pazienti coinfecti.

Immunoattivazione

L'infezione da HIV causa una disfunzione immunitaria nell'ospite rendendolo più suscettibile a malattia. La deplezione delle cellule T CD4+ è il difetto immune più importante che contribuisce allo sviluppo di infezioni AIDS-correlate. L'infezione diretta e la distruzione di cellule T CD4+, in particolare la sottopopolazione *central memory*, contribuiscono alla deplezione delle cellule T CD4+, specialmente nelle fasi precoci di infezione da HIV. Inoltre, l'immunoattivazione (IA) e la morte cellulare indotta dall'attivazione sono anche i maggiori fattori influenzanti questo processo di deplezione [56]. L'IA è anche associata a infiammazione cronica e attivazione del sistema di coagulazione che incrementa il rischio di eventi seri non-AIDS-relati come malattia vascolare aterosclerotica, osteoporosi, osteonecrosi e malattia renale cronica [57].

L'IA HIV-relata è caratterizzata da un'attivazione delle cellule B policlonali [58], alto turnover delle cellule T sia CD4+ che CD8+ con un'incrementata espressione sulla superficie cellulare di molecole indicative di attivazione cellulare stessa [59] e alti livelli circolanti di citochine e chemochine proinfiammatorie [60].

L'IA cronica HIV-relata non è solo una conseguenza della continua replicazione virale ma rappresenta piuttosto un fenomeno complesso e multifattoriale che ultimamente sembrerebbe giocare un ruolo importante nell'omeostasi alterata dei linfociti T, sia per una non normale funzione immune che anche per una compromissione nella risposta alla terapia antivirale [61]. Inoltre, anche le nuove cellule T attivate sono bersaglio di HIV sostenendo la replicazione virale [62] e perciò creando un circolo vizioso fra

la replicazione di HIV e l'IA. Per questi motivi non è sorprendente che l'IA è stata a lungo identificata come la maggior causa determinante la progressione di malattia indipendentemente dai livelli di viremia HIV [56,63,64]. Si nota inoltre come la HAART, nonostante conduca a una viremia HIV soppressa, non è completamente sufficiente a spegnere l'IA, e invece accade spesso che soggetti HIV-positivi con uno scarso recupero di linfociti T CD4+ in HAART efficace spesso presentino alti livelli di IA. Tuttora il meccanismo dell'IA associato ad HIV rimane non del tutto compreso, ed è possibile che fattori specifici contribuiscano in modo differente a questo pattern clinico nei differenti sottogruppi di pazienti. I meccanismi proposti correlati all'IA cronica da HIV sono: i) l'effetto diretto dei prodotti genetici del virus (Env, Nef, e Tat, etc.), ii) la risposta immune innata e adattiva al virus HIV, iii) una regolazione inefficace della risposta immune antivirale normalmente prodotta, iv) l'attivazione dei linfociti T e B determinata da un incremento dei livelli delle citochine proinfiammatorie (es. fattore di necrosi tumorale alfa [TNF- α], interleuchina-1 [IL-1], IL-6 e altri), v) la presenza di coinfezione clinica o subclinica, e più recentemente vi) la predilizione di infezione delle cellule T CD4+ *central memory* come fattore responsabile della concentrazione della maggior parte del carico antigenico nel tessuto linfoide centrale [65,66].

Si è già sottolineato come la coinfezione HIV-HCV possa peggiorare il quadro di infezione da HIV. Si è visto come nei soggetti coinfetti HIV-HCV vi siano elevati livelli di attivazione CD8+-mediata rispetto i soggetti monoinfetti HIV [67,68]. Gonzalez *et al.* hanno dimostrato come il trattamento anti-HCV

in pazienti in HAART stabile condurrebbe a una diminuzione dei livelli di IA (confrontati con i parametri di IA pre-terapia anti-HCV) [67].

In uno studio del 2009 [67] si è evidenziato come i pazienti coinfecti HIV-HCV presentino alti livelli di IA cellulare T CD4+ e CD8+, attraverso l'espressione del CD38+ nonostante una HAART efficace condizionante HIVRNA soppresso. Questa condizione si presenta associata alla positività di HCVRNA e l'espressione del CD38+ diminuisce quando viene soppressa la replicazione di HCV attraverso il trattamento antivirale. Ciò potrebbe suggerire che alti livelli di IA siano guidati da alti valori di HCVRNA. Inoltre è ben noto che al termine della terapia antiHCV, finendo l'effetto leucopenico del PegIFN- α , la conta delle cellule T CD4+ e CD8+ aumenta nuovamente, invece ciò non sembrerebbe accadere per le cellule CD38+.

Traslocazione microbica

La traslocazione intestinale di batteri o altri microbi è definita come il passaggio non fisiologico della microflora gastrointestinale attraverso la barriera epiteliale intestinale, la lamina propria ed alla fine nei linfonodi mesenterici locali e, da lì, verso siti extranodali [69,70]. In circostanze normali, i microbi traslocati e i prodotti microbici sono fagocitati all'interno della lamina propria e dei linfonodi mesenterici [71]. Tuttavia, se il sistema immune mucosale dell'ospite è compromesso, questo meccanismo difensivo potrebbe fallire così da permettere l'ingresso e la sopravvivenza di batteri i siti extranodali a distanza [71-73]. Il lipopolisaccaride (LPS), un componente della parete batterica dei Gram negativi e un noto agonista del Toll-like receptor 4 (TLR-4) [74], è considerato uno dei maggiori marker di TM [75-

77]. Da sottolineare come LPS induca diverse risposte nel sistema immune innato, con interazioni di LPS con la proteina legante LPS (LBP), che trasferisce LPS nelle membrane o di CD14 solubile (sCD14) inducendo l'attivazione di NF- κ B e la produzione citochinica [78], così determinando uno stato di IA aberrante. Durante l'infezione da HIV infatti si verifica una drastica deplezione delle cellule T CD4+ nell'intestino [79] condizionando il danno della componente immune della mucosa gastrointestinale inducendo un incremento dei prodotti di traslocazione microbica, in particolare LPS, nonostante non sia ancora stato stabilito un nesso diretto di causa-effetto fra danneggiamento della mucosa e traslocazione microbica [80]. Livelli circolanti aumentati di LPS correlano con immunoattivazione giocando un ruolo chiave nella patogenesi della progressione di malattia e della linfopenia CD4+ [80-82].

Recentemente, il ruolo di LPS è stato anche analizzato come possibile causa sottostante della malattia epatica in quanto sembrerebbe promuovere la fibrosi epatica in soggetti coinfecti HIV-HCV. Soggetti con monoinfezione HCV hanno un alto grado di traslocazione microbica ed elevati livelli di LPS sono strettamente associati alla severità di malattia epatica [83,84]. Inoltre in un modello animale si è visto come la fibrosi epatica appaia accelerata attraverso stimolazione delle cellule di Kupffer e delle cellule epatiche stellate sia direttamente con prodotti microbici dati dalla secrezione di citochine profibrotiche come IL-4, IL-5, IL-13 e TGFB, che indirettamente attraverso l'induzione della risposta immune sistemica e la promozione di morte apoptotica di epatociti locali indotta dall'attivazione con la risultante di deposizione di collagene incremento dell'immunoattivazione [85,86].

Balogopal *et al.* hanno evidenziato che in soggetti HIV-positivi i parametri di traslocazione microbica sono fortemente associati con i marker di progressione di malattia epatica HCV-relata (es. cirrosi) [86].

In uno studio recente con dati della Fondazione ICONA, considerando il fatto che sCD14 possa impedire l'interazione fra LPS e il recettore di membrana fagocitica CD14, alti livelli di sCD14 potrebbero proteggere la funzione epatica attraverso una *down-regulation* della cascata infiammatoria [87].

Sebbene molti fattori sono stati associati a una risposta completa alla terapia anti-HCV, ancora però scarsamente definiti sono i determinanti immunologici correlati al successo terapeutico [88-91].

Componente immunitaria T CD4+

Grazie alla terapia HAART soppressiva il valore dei linfociti T CD4+ periferici può aumentare con riduzione della morbidità e mortalità dei soggetti ma sono sempre più a rischio rispetto i pazienti HIV-negativi. Questo rischio è predetto in parte dalla conta di cellule T CD4+ in corso di terapia antiretrovirale, sebbene il valore possa raggiungere livelli apparentemente normali ciò potrebbe significare una non piena capacità immunitaria [92-96]. Infatti si è dimostrato come anche pazienti trattati con HAART con una conta di CD4+ >500 cell/μL, un ulteriore aumento del valore dei linfociti T CD4+ sia correlato a un beneficio in termini di mortalità [97].

L'importanza della conta dei CD4+ come forte predittore di infezione opportunistica e di eventi non-AIDS correlati è stato ampiamente indagato, meno invece è stato l'interesse nei confronti della conta delle cellule T CD8+.

Nel corso di infezione da HIV non trattata, le cellule T CD8+ aumentano di pari passo al declino delle cellule T CD4+ [98]. Invece in corso di terapia HAART, alcuni individui che presentano cellule CD4+ >500/ μ L possono avere un declino di cellule CD8+ portando a normalizzazione il rapporto CD4+/CD8+. Altri pazienti invece mantengono sempre alti livelli di cellule T CD8+ e di conseguenza un rapporto CD4+/CD8+ costantemente basso [99]. Si è visto che in soggetti anziani HIV-negativi un rapporto CD4+/CD8+ <1 predice la mortalità di tutte le cause ed è considerato parte del fenotipo dell'immunosenescenza [100,101]. In uno scenario di infezione HIV non trattata, il rapporto CD4+/CD8+ correla con il tempo di insorgenza allo stadio di AIDS [102] ed è associato alla conta CD4+ e CD8+ pre-HAART [99,103]. Tra i pazienti HIV-positivi trattati il rapporto invece appare essere correlato ai marker di attivazione T-cellulare e della senescenza [104,105] e con il rischio di morbidità e mortalità non-AIDS relata [106-108]. Ciò appare particolarmente vero in quei soggetti dove non è nota la normalizzazione della conta T CD4+.

Il gruppo del Dr. Deeks [109] ha indagato come in pazienti HIV-positivi in HAART con linfociti CD4+ >500 ma un basso rapporto CD4+/CD8+ presentino sempre una maggior espansione della conta CD8+ per persistenza dell'IA, valutati attraverso cellule HLADR+CD38+ e un maggior pattern di senescenza (CD28- e CD57+CD28-). Inoltre si è visto che il permanere di un rapporto CD4+/CD8+ basso sia correlato a un più alto rischio di morbidità/mortalità.

Come è noto da studi precedenti [67,110], la coinfezione HCV è associata sia a una diminuita conta di linfociti T CD4+ sia ad elevati livelli di IA,

suggerendo che il meccanismo della ridotta conta di cellule CD4+ sia correlato all'IA. Inoltre, se si considera che la perdita dei linfociti T CD4+ si verifica precocemente e si stabilizza, trattare l'infezione da HCV il prima possibile diventa prioritario per tentare di ridurre l'IA e recuperare in numerosità le cellule T CD4+.

Immunological non responders

Essendo la coinfezione HCV la più importante causa di morte dei pazienti HIV-positivi [111], sarebbe utile un maggior controllo e una strategia di trattamento anti-HCV per incrementare la risposta e diminuire la mortalità correlate a patologie epatiche.

In particolar modo, è stato posto il problema, in era di duplice terapia anti-HCV, come e quando trattare l'HCV nei pazienti HIV-positivi in soppressione virologica grazie a una HAART efficace ma *Immunological-non-Responders* (INRs). Questi pazienti non recuperano cellule T CD4+ nonostante la terapia antiretrovirale prolungata e nei diversi studi si è visto che sono compresi tra il 9-45% a seconda delle popolazione considerate [112,113]. Questa situazione appare essere correlata a un basso nadir di linfociti T CD4+ ($\leq 200 \text{ cell}/\mu\text{L}$ o $\leq 25\%$) con ovviamente uno stretto rapporto con la progressione di malattia ad AIDS e alla morte [114-117].

Come già in precedenza enunciato la progressione di HIV, la coinfezione HCV e il basso numero di linfociti T CD4+ sono tutti correlati a una persistente IA [58,63].

Tendenzialmente, come anche le linee guida enunciavano prima dell'avvento dei regimi interferon-free, la preferenza era iniziare la terapia in soggetti con

cellule CD4+ almeno >250cell/ μ L per evitare l'ulteriore abbassamento delle difese immunitarie in corso di PegINF- α con il rischio di un aumento del rischio di infezioni opportunistiche [118,119]. Il meccanismo della leucopenia IFN-correlata sembra essere dovuto a un possibile effetto inibitorio sui fattori di crescita ematopoietici che potrebbe colpire la differenziazione nello stadio precoce, così come a un cambiamento nella distribuzione cellulare indotta dallo stesso PegINF- α . Tutto ciò è di maggior rilevanza nei pazienti HIV-positivi sebbene il ruolo preciso del trattamento interferonico sulle cellule T CD4+ non è stato ancora spiegato chiaramente, sembrerebbe la riduzione nel numero del sottogruppo dei linfociti sia stata correlata a ridistribuzione. E' stato infatti sempre preferibile in pazienti con cellule T CD4+ soprattutto inferiori ai 200 cell/ μ L, rimandare la terapia anti-HCV fino a un incremento confidando nella risposta alla terapia ART ma purtroppo non sempre la risposta immunitaria è avvenuta.

In anni recenti, si sono valutate intensificazioni di terapia antiretrovirale per raggiungere lo scopo di risposta immunologica. In particolare Maraviroc (MVC), antagonista del recettore CCR5, è stato dimostrato avere un'attività anti-infiammatoria. Il farmaco potrebbe avere un potenziale ruolo nella *down-regulation* dell'infiammazione cronica HIV-associata attraverso il blocco del ricircolo e del *trafficking* dei macrofagi e delle cellule dendritiche derivate da monociti [120]. Da ciò deriverebbe una ridistribuzione delle cellule T CD4+ nel sangue periferico attraverso l'inibizione della chemotassi al tessuto linfoide o direttamente attraverso attivazione delle cellule T interessate.

MVC dai dati presentati da Wilkin *et al.* sembrerebbe ridurre i marker di IA e di apoptosi ma la condizione sembrerebbe parzialmente reversibili alla

sospensione [121]. Comunque sul reale aumento dei linfociti T CD4+ in corso di MVC vi sono ancora dati contrastanti.

Trattamento anti-HCV e risposta terapeutica

I pazienti con infezione cronica da HCV, valutata attraverso lo screening di anticorpi per HCV seguiti dalla rilevazione di HCVRNA, sono attualmente in Italia trattati con una combinazione di duplice terapia con PegIFN- α 2a/b più ribavirina (RBV) per i genotipi 2,3 e 4, mentre per i genotipi 1, in base alle condizioni di fibrosi del paziente e di eventuali precedenti trattamenti falliti è possibile decidere se trattare con duplice terapia o triplice terapia, la quale comprende oltre i farmaci della duplice un inibitore della proteasi NS3/4A di HCV di prima generazione chiamati antivirali ad azione diretta (DAA) - telaprevir o boceprevir - anche se in questi giorni di stesura della tesi stanno decidendo i criteri di trattamento con nuove combinazioni di farmaci anti-HCV *interferon-free*.

La duplice terapia porta al successo terapeutico tra il 20-55% [122,123]., variabile in base al genotipo – 1 e 4 considerati i genotipi “difficili”-, la presenza di coinfezione con HIV e altri fattori negativi come un alto indice di massa corporea (BMI), l’etnia africana, il sesso maschile, l’età più avanzata, una peggior fibrosi epatica, e l’insulino-resistenza [124]. Questa quota di risposta viene però aumentata almeno per il genotipo 1 grazie ai DAA che agiscono direttamente sul ciclo vitale del virus; in questo caso i tassi di guarigione incrementano tra un 31-84% per telaprevir [125,126] e tra un 38-75% per boceprevir [127-129] a seconda della precedente risposta alla

terapia, al grado di fibrosi del paziente, alla risposta nei primi mesi di trattamento.

Il meccanismo di azione PegIFN- α prevede una cascata intracellulare che determina uno stato antivirale di *down-regulation* della sintesi delle proteine virali. Inoltre, PegIFN- α esercita un effetto immunomodulatorio a diverse sfaccettature come l'attivazione cellule NK, la produzione citochine, la prevenzione dell'apoptosi T-cellulare, e l'incremento della presentazione dell'antigene attraverso *up-regulation* del complesso maggiore di istocompatibilità classe II sulle cellule presentanti l'antigene (APC) [130].

Per quanto riguarda il meccanismo di azione della RBV sembra comprendere un effetto immunomodulatorio dove una risposta immune T-helper 1 piuttosto che T-helper 2 è incentivata. [131]. Inoltre, RBV potrebbe causare mutazioni nel genoma HCV conducenti la produzione di particelle virali difettive con ridotta infettività [130]. In aggiunta, effetti positivi sulla seconda fase di declino virale è stata osservata come risultato della terapia duplice di combinazione in quanto riflette eliminazione immuno-mediata degli epatociti infetti [132].

Da sottolineare come però la duplice terapia non sia esente da eventi avversi come sintomatologia simil-influenzale, disturbi gastrointestinali, alterazioni umorali e depressione midollo osseo [133], che possono compromettere seriamente la qualità di vita del paziente e condizionare l'aderenza alla terapia.

La durata della terapia è spesso determinata dalla cinetica virale di risposta al trattamento che a sua volta dipende in modo considerevole dal genotipo HCV. Attualmente le linee guida per i pazienti coinfecti HIV-HCV parlano da

24 a 48 settimane per i genotipi 2-3 con terapia duplice, per genotipi 4 48 settimane sempre con duplice terapia e per i genotipi 1 48 settimane nei pazienti in cui si esegue la duplice, 24-48 settimane in base alla RVR per i pazienti in corso di triplice terapia.

I livelli plasmatici di HCVRNA sono comunemente monitorati al basale, alla week 4, 12, 24 e 48. Anche se oggi con i nuovi DAA si tende a misurare la viremia anche alla week 2 e 6 per valutare eventuali *breacktrough* e *blip* virali per evitare lo sviluppo di resistenze ai nuovi farmaci. La risposta virologica sostenuta è definita come HCVRNA non rilevabile 24 settimane dopo il termine della terapia, dopo il quale il rischio di riattivazione del virus è minimo. La situazione in cui i pazienti ottengono una HCVRNA non rilevabile alla week 4 è definita risposta virologica rapida (RVR) e questo comporta una maggior possibilità di ottenere SVR indipendentemente dal genotipo [134]. Inoltre, la precoce risposta virologica (EVR) è definita come HCVRNA non rilevabile a 12 settimane di trattamento [135]. I pazienti che hanno ottenuto a 12 settimane una riduzione ≥ 2 log dal basale vengono definiti *partial responder* mentre quelli con un calo < 1 log alla 12 settimana di terapia vengono classificati come *null responder* e hanno una bassa probabilità di ottenere una SVR [136].

Le risposte virologiche sono indicative dell'*outcome* di trattamento e sono strumenti utili per le decisioni terapeutiche per il raggiungimento dell'*endpoint*.

OBIETTIVI

1. Data l'importanza di fattori predittivi precoci di efficacia terapeutica, soprattutto di EVR, in modo da limitare al minimo l'esposizione ai farmaci sia per un discorso di effetti collaterali che per i costi dei farmaci, abbiamo valutato marcatori clinici, immunologici e di traslocazione microbica prima dell'inizio della terapia antivirale duplice correlati ad EVR e/o SVR in pazienti coinfecti HIV-HCV (sezione 1a). Inoltre, in considerazione dell'attività immunomodulante di PegIFN- α abbiamo valutato sempre in modo inerente alla predittività di risposta antivirale i cambiamenti immunofenotipici delle sottopopolazioni di cellule T in corso di trattamento anti-HCV sempre in pazienti coinfecti HIV-HCV (sezione 1b).
2. Considerato l'effetto di MVC sull'immunoricostituzione, abbiamo ipotizzato che l'intensificazione HAART con tale farmaco potesse bilanciare il danno immunitario correlato a PegIFN- α /RBV in tre pazienti coinfecti HIV-HCV INR.

MATERIALI E METODI

Obiettivo 1a

Disegno dello studio e popolazione. Si è retrospettivamente analizzato pazienti coinfetti HIV-HCV positivi seguiti presso l'Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Brescia, "Spedali Civili", Brescia e la Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Milano, Ospedale "San Paolo", Milano fra Gennaio 2005 e Dicembre 2009. Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Brescia e dall'Università di Milano. Ogni paziente ha dato il suo consenso informato alla raccolta di campioni ematici a scopi di ricerca, sotto forma di modulo approvato dal Comitato Etico locale.

I criteri di inclusione era che i pazienti si fossero somministrati almeno una dose di Peg-IFN- α 2a o 2b per via sottocutanea una volta a settimana (180 μ g o 1.5 μ g/kg) più ribavirina giornalmente dosata in base al peso corporeo (1000mg/die per un peso pretrattamento <75 kg o 1200 mg/die per un peso \geq 75 kg).

Secondo la risposta virologica alla settimana 12 di trattamento i pazienti sono stati classificati in: i) "*early virological responders*" (EVR) con HCVRNA soppresso (<50 UI/mL - valore nel periodo considerato) o una riduzione $\geq 2\log_{10}$ dal *baseline* dopo 12 settimane di terapia; ii) "*null responder*" (NR) , HCVRNA \geq 50UI/mL e una riduzione <2log₁₀ dal *baseline*.

SVR era definito come HCVRNA < 50 UI/mL 24 settimane dopo il termine della terapia anti-HCV considerata di 48 o 72 settimane in base al genotipo

del virus HCV. Il *baseline* è stato definito come il momento di introduzione della terapia anti-HCV (entro 1 mese prima dall'inizio della terapia). I soggetti persi al follow-up prima della settimana 12 o prima del momento stabilito per l'SVR sono stati considerati rispettivamente NR e "*Sustained Virological Non Responders*" (N-SVR).

Stadiazione della malattia epatica. Lo stadio di malattia epatica è stato valutato in un sottogruppo di pazienti sottoposti a biopsia epatica percutanea o attraverso Fibroscan® considerando la *stiffness* epatica. Venivano considerati solo gli esami con un range interquantile (IR) sotto il 30% del valore mediano e un *success rate* (SR) maggiore del 60% [137]. Per valutare l'attività necro-infiammatoria e la fibrosi era stato considerato lo score di Knodell Ishak-modificato. La fibrosi avanzata era definita come uno score di Knodell pari a F3-4 sulla biopsia epatica o una *stiffness* maggiore di 12.5 kPa al Fibroscan. La cirrosi epatica era definita in base alla presenza di criteri istopatologici, nodularità sulla superficie epatica vista all'ecografia e una *stiffness* maggiore a 17kPa.

Analisi di traslocazione microbica (TM) e immunoattivazione (IA). I livelli plasmatici di LPS e sCD14 sono stati misurati su campioni prelevati a digiuno con kit commerciali (Test Limulus Amebocyte, Cambrex, Italia; test ELISA, R&D, Milano, Italia) come precedentemente descritto [81].

Gli HLA-DR+CD38+CD4+/CD8+ attivati sono stati valutati su PBMC scongelati; HLA-DR fluorescina isotiocianato (FITC), CD38 phycoerytrin (PE), CD4 PerCPcyanin 5.5, CD8 PerCPcyanin 5.5 (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Sono state esaminate le seguenti combinazioni: CD4/HLA-

DR/CD38, CD8/HLA-DR/CD38. La proporzione di HLA-DR+CD38+ era calcolata su cellule T CD4+ e CD8+ selezionate.

Analisi statistica. Le differenze di *baseline* fra i due gruppi di pazienti sono state valutate usando rispettivamente test U non-parametrico Mann-Whitney e un test Chi-squared per variabili continue e categoriche. Il confronto di TM e immunoattivazione fra i pazienti con HCV genotipo 1-4 *versus* 2-3, fibrosi assente-moderata *vs* avanzata, cirrosi *vs* assenza della stessa, pazienti EVR *vs* NR ed SVR *vs* N-SVR è stato eseguito con test U Mann-Whitney. Il modello di regressione logistica multivariata era usato per identificare i parametri di baseline che fossero indipendentemente associati con EVR o SVR. L'analisi multivariata è stata eseguita in 65/98 pazienti per i quali i parametri clinici, epidemiologici e biologici fossero disponibili. Fattori considerati nel modello di regressione logistica erano l'età, il sesso, la conta cellulare T CD4+ al baseline, il genotipo HCV, l'HCVRNA, la fibrosi, la cirrosi e la TM. Le analisi sono state eseguite attraverso il software (SPSS) (versione 18).

Obiettivo 1b

Disegno dello studio e popolazione. Successivamente si è considerato retrospettivamente un secondo gruppo di pazienti coinfecti HIV-HCV seguiti presso la Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Milano, Ospedale San Paolo, Milano fra Settembre 2008 e Ottobre 2014.

I criteri di inclusione erano gli stessi enunciati al punto “obiettivi 1a” con inoltre richiesta soppressione virologica per la malattia HIV (HIVRNA <40 copie/mL) in corso di terapia antiretrovirale (ART).

I pazienti erano considerati in base alla risposta virologica nei confronti della terapia anti-HCV come nell’ “obiettivo 1a” con la modifica del limite di detezone di HCVRNA considerato soppresso con valore <12 UI/mL.

SVR era sempre definita come HCVRNA <12 UI/mL 48 settimane dopo il termine della terapia anti-HCV.

Stadiazione della fibrosi epatica. A differenza dell’altro studio, in questo caso lo stadio di fibrosi epatica è stato valutato con test non invasivi come APRI score e FIB-4. L’APRI è una misurazione non invasivo di fibrosi epatica, rapporto dell’aspartato transaminasi (AST) sulla conta piastrinica, calcolato come $100 \times [(livello\ AST / limite\ superiore\ del\ valore\ AST)] / conta\ piastrinica$ [138]. Con APRI un limite <0.5 viene tradotto come assenza di fibrosi mentre >1.5 è associato alla presenza di fibrosi avanzata/cirrosi.

Il FIB-4, invece, è sempre un test non invasivo per la fibrosi epatica calcolato con la seguente formula $(età[anni] \times AST(U/L) / piastrine [10^9] \times \sqrt{AST [U/L]})$, formulato per i pazienti coinfecti. Per lo scopo della nostra ricerca abbiamo usato come endpoint un valore di FIB-4 >1.45, basato sui dati di letteratura che hanno mostrato come un limite <1.45 sia un valore predittivo negativo per escludere la fibrosi avanzata (F4-F6 secondo la classificazione di Ishak) del 90% e che un limite >3.25 abbia un valore predittivo positivo per la diagnosi di fibrsoi avanzata nel 65% casi [139].

Analisi di immunoattivazione. I fenotipi immunologici periferici (CD38+/-CD127+) sono stati analizzati su campioni di sangue intero attraverso citofluorimetria nel Laboratorio Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera San Paolo al baseline (T1), alla settimana 4 (T2), 12 (T3), 48 (T4) e 24 settimane dopo il termine della terapia (T5). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi fluorocromati: CD45-APC, CD3-PE-Cy7, CD8-PECy5, CD127-PE, CD38-FITC (BD Bioscience, San Diego, CA). E' stata usata la seguente combinazione CD45/CD3/CD8/CD127/CD38.

Brevemente, il sangue intero è stato marcato per 20 minuti al buio a temperatura ambiente, successivamente il campione è stato lisato con una soluzione a base di ammonio cloruro per 15/20 minuti e lavato con PBS. I campioni sono stati fissati con PFA 1% e acquisiti con BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA) e analizzati con il software BD FACSDiva (Becton Dickinson, San Diego, CA). I linfociti di interesse sono stati identificati dapprima sulla base delle proprietà morfologiche (FSC e SSC), poi sono stati selezionati come CD45+, CD3+ e infine come CD38+/CD8+ o CD127+/CD8+.

Analisi statistica. I dati quantitativi sono stati presentati come mediana e range interquartile (IQR), mentre i dati categorici come numero assoluto e percentuale.

I parametri immunologici sono stati confrontati tra i diversi time points attraverso il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati.

La risposta alla terapia anti HCV è stata definita nel seguente modo: RVR, EVR, EOT e SVR.

Inoltre, abbiamo analizzato l'associazione tra diversi parametri demografici ,

HIV- e HCV-correlati del *baseline* e la risposta alla terapia anti-HCV (RVR, EVR, EOT, SVR) attraverso test non parametrico di Mann-Whitney e test Chi quadrato.

Le analisi sono state effettuate attraverso il software SPSS (SPSS, versione 21.0).

Obiettivo 2

I tre pazienti coinfecti HIV-HCV presi in considerazione erano seguiti presso la Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Milano, Ospedale San Paolo, classificati come INR per non aver ottenuto nonostante terapia antiretrovirale efficace un recupero immunologico tale da permettere eventuale trattamento anti-HCV. Dei tre pazienti erano stati presi in considerazione le caratteristiche cliniche, immunologiche (conta e percentuale di cellule T CD4+ e CD8+) e stadio di fibrosi epatica tramite APRI e FIB-4. Dal punto di vista immunofenotipico si è ripetuto il procedimento descritto nell' "obiettivo 1b".

Tutti e tre i pazienti sono stati trattati per 48 settimane con terapia anti-HCV composta da PegIFN- α 2a per via sottocutanea (180 μ g/settimana) più RBV assunta quotidianamente dosata in base al peso corporeo del soggetto.

RISULTATI

Obiettivo 1a

Popolazione dello studio. Sono stati arruolati 98 pazienti HIV-HCV positivi sottoposti a terapia anti-HCV. La Tabella 1 mostra le caratteristiche cliniche, epidemiologiche e di laboratorio dei pazienti in studio. Settantuno pazienti (72.5%) aveva ottenuto l'EVR; 27 soggetti (27.5%) sono stati definiti NR. Otto pazienti hanno interrotto terapia prima della settimana 12 e sono stati persi al follow-up (Tab.1). I due gruppi di pazienti erano confrontabili per parametri demografici, HIV-correlati e metabolici (Tab.1).

TM e parametri HCV-relati. I livelli plasmatici di LPS e sCD14 sono stati valutati in un sottogruppo di pazienti non selezionato per i quali era disponibile il campione plasmatico (65 e 91 campioni rispettivamente). Le caratteristiche di baseline dei 65 e 91 pazienti per cui è stato analizzato rispettivamente LPS e sCD14 erano comparabili alla popolazione principale in studio.

Confrontando la malattia epatica iniziale-moderata, la presenza di fibrosi epatica avanzata non era associata a più alti livelli di sCD14 [mediana sCD14, pazienti con fibrosi epatica avanzata: 3, (IQR 2.53-3.48), $p=0.128$], (Fig.1a).

I pazienti con cirrosi erano caratterizzati da un trend di più alti livelli plasmatici, nonostante non raggiunga significatività statistica [mediana

sCD14, pazienti con cirrosi: 3.09, (IQR 2.62-4.22) – pazienti senza cirrosi: 2.79, (IQR 2.29-3.44), $p=0.052$], (Fig.1c).

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e immunovirologiche al *baseline* della popolazione in studio.

Characteristics	Patients (98)	EVR (71)	NR (27)	p (EVR vs NR)
Age, years *	44 (41-46)	44 (41-46)	43 (40-46)	0.461
Gender, male °	81 (82.7)	57 (80.3)	24 (88.9)	0.385
Time since 1 st diagnosis of HIV, (years) *	18 (13-20)	18 (13-21)	19 (12-20)	0.466
Duration of cART, (years) *	10 (8-13)	10 (8-14)	10 (5-12)	0.592
cART °				0.845
Naïve	2 (2)	1 (1.5)	1 (3.7)	
NNRTI+NRTI	14 (14.3)	11 (15.5)	3 (11.1)	
NRTI+PI	74 (75.5)	53 (74.6)	21 (77.8)	
Other	8 (8.2)	6 (8.4)	2 (7.4)	
Exposure categories °				0.778
MSM	3 (3)	2 (2.8)	1 (3.7)	
WSM	8 (8.2)	5 (7)	3 (11.1)	
IDUs	87 (88.8)	64 (90.2)	23 (85.2)	
Previous AIDS diagnosis °	24/93 (25.8)	14/67 (20.9)	10/26 (38.5)	0.082
CD4+ T cells/ μ L nadir *	152 (67.5-251.5)	173 (106.5-258.5)	100 (36-198)	0.045
Baseline CD4+ T cells/ μ L *	430 (321.5-567)	433 (321-555)	428 (300-687)	0.659
CD4+ T cells % *	26.9 (21.9-33)	27.6 (22.1-33.7)	25 (19.9-29.1)	0.274
CD8+ T cells/ μ L *	601.5 (467.5-939)	626 (429-900)	589 (492-1132)	0.556
CD8+ T cells % *	40.9 (33.9-47)	40.3 (33.6-47)	41.2 (34.1-48.5)	0.578
Baseline HIV-RNA log ₁₀ cp/mL *	1.7	1.7	1.7	0.893
Time to HIV-RNA <40 cp/mL (months) *	41 (20-69)	41 (18-72.2)	43 (20-68.7)	0.569
HCV genotypes °				0.0001
1-4	45 (45.9)	23 (32.4)	22 (81.5)	
2-3	53 (54.1)	48 (67.6)	5 (18.5)	
Baseline HCV-RNA log ₁₀ IU/mL *	5.5 (4.9-6.03)	5.6 (4.8-5.8)	5.8 (5.2-6.5)	0.015
Cirrhosis °	30/94 (31.2)	18/69 (26.1)	12/25 (48)	0.044
Advanced fibrosis °	43/89 (48.3)	29/66 (43.9)	14/23 (60.9)	0.162
HBV infection (HBsAg+) °	7 (7.1)	4 (5.6)	3 (11.1)	0.390
Serum AST (U/L) *	109.8 (42.2-94)	67 (42-94)	71 (42-103)	0.972
Serum ALT (U/L) *	89 (55-137.2)	97 (51-145)	85 (58-110)	0.548
BMI *	22.9 (21.2-25.1)	22.9 (21.1-25.4)	22.8 (21.6-25.6)	0.320
Glycemia (mg/dL) *	89 (83-97.5)	90 (83.7-101.7)	88 (79.2-96.5)	0.492
Insulinemia (U/L) *	12.9 (9.4-20.1)	13 (9.4-20.6)	11 (8.1-18.2)	0.526
Alcohol (gr/die) *	0 (0-11)	0 (0-10)	0 (0-5)	0.755
HOMA index *	2.6 (1.7-4.1)	2.5 (1.7-4)	2.9 (1.6-4.3)	0.972

Legenda. I dati sono presentati come *mediane, (IQR) e °numero assoluto, (%). Le differenze fra i due gruppi erano confrontate con *test U di Mann Whitney e °test χ^2 .

In modo simile i pazienti con HCV genotipo 1-4 tendevano a mostrare più alti livelli di sCD14 [mediana sCD14, HCV genotipo 1-4: 3.07, (IQR 2.56-3.86) – HCV genotipo 2-3: 2.75, (IQR 2.2-3.48), $p=0.053$], (Fig.1e). Allo scopo di indagare ulteriore associazione fra sCD14 circolante e il genotipo HCV, si

sono valutate 2 analisi più specifiche: i) escludendo i pazienti con fibrosi avanzata; ii) escludendo i pazienti con cirrosi. Interessante come i pazienti con genotipo 1-4 mostravano ancora un più alto valore significativo di sCD14 secondo le analisi i) e ii) [i): mediana sCD14 HCV genotipo 1-4: 3.1, (IQR 2.6-3.7 – HCV genotipo 2-3: 2.6, (IQR 1.9-2.8), $p=0.022$; ii): mediana sCD14, HCV genotipo 1-4: 3.07, (IQR 2.6-3.7) – HCV genotipo 2-3: 2.63, (IQR 2.1-3.2), $p=0.028$].

Come mostrato nelle Figure 1b, d e f, non vi erano associazioni significative fra livelli di LPS e fibrosi avanzata, cirrosi e genotipi HCV.

Attivazione cellulare T e parametri HCV correlati. Abbiamo valutato l'espressione di HLA-DR e del CD38+ sulle cellule T CD4+ e CD8+ in un sottogruppo non selezionato di 53 pazienti con a disposizione i campioni di PBMC. Le caratteristiche di questo sottogruppo di pazienti erano comparabili con la popolazione principale in studio.

I numeri di cellule T attivate erano visti confrontando pazienti con fibrosi avanzata rispetto a quelli con assenza o iniziale-moderata [HLA-DR+/CD38+/CD4+, fibrosi avanzata: 30.8, (IQR 13.9-46.8) – assenza o iniziale-moderata fibrosi: 25.8, (IQR 16.2-43.5), $p=0.957$; HLA-DR+/CD38+/CD8+, fibrosi avanzata: 39.9, (IQR 21.8-63.8) – assenza o iniziale- moderata fibrosi: 41.01, (IQR 28.6-53.2), $p=0.513$] (Fig.2a,b) e in pazienti con cirrosi rispetto a quelli senza cirrosi [HLA-DR+/CD38+/CD4+, cirrosi: 28.9, (IQR 13.3-47.8) –assenza di cirrosi: 25.8, (IQR 16.2-44.1), $p=0.971$; HLA-DR+/CD38+/CD8+, cirrosi: 41.9, (IQR 23.6-69.2) – assenza di cirrosi: 41.1, (IQR 27.1-56.2), $p=0.62$] (Fig.2c,d).

Figura 1. La maggior traslocazione microbica è associata a HCV genotipi 1-4 e cirrosi.
a)-b) sCD14 e LPS erano confrontati fra pazienti con fibrosi avanzata (AF) e fibrosi non avanzata (N-AF). **c)-d)** sCD14 e LPS erano confrontati fra pazienti con cirrosi e assenza di cirrosi (N-cirrhosis). **e)-f)** sCD14 e LPS erano confrontati fra pazienti con HCV genotipo 1-4 e genotipo 2-3. Ogni punto rappresenta il valore plasmatico di un singolo soggetto. sCD14 e LPS erano misurati in campioni plasmatici; sCD14 ug/mL, LPS pg/mL. p-value erano valutato attraverso tesi U Mann-Whitney. $p>0.05$ era considerata non significativa (NS).

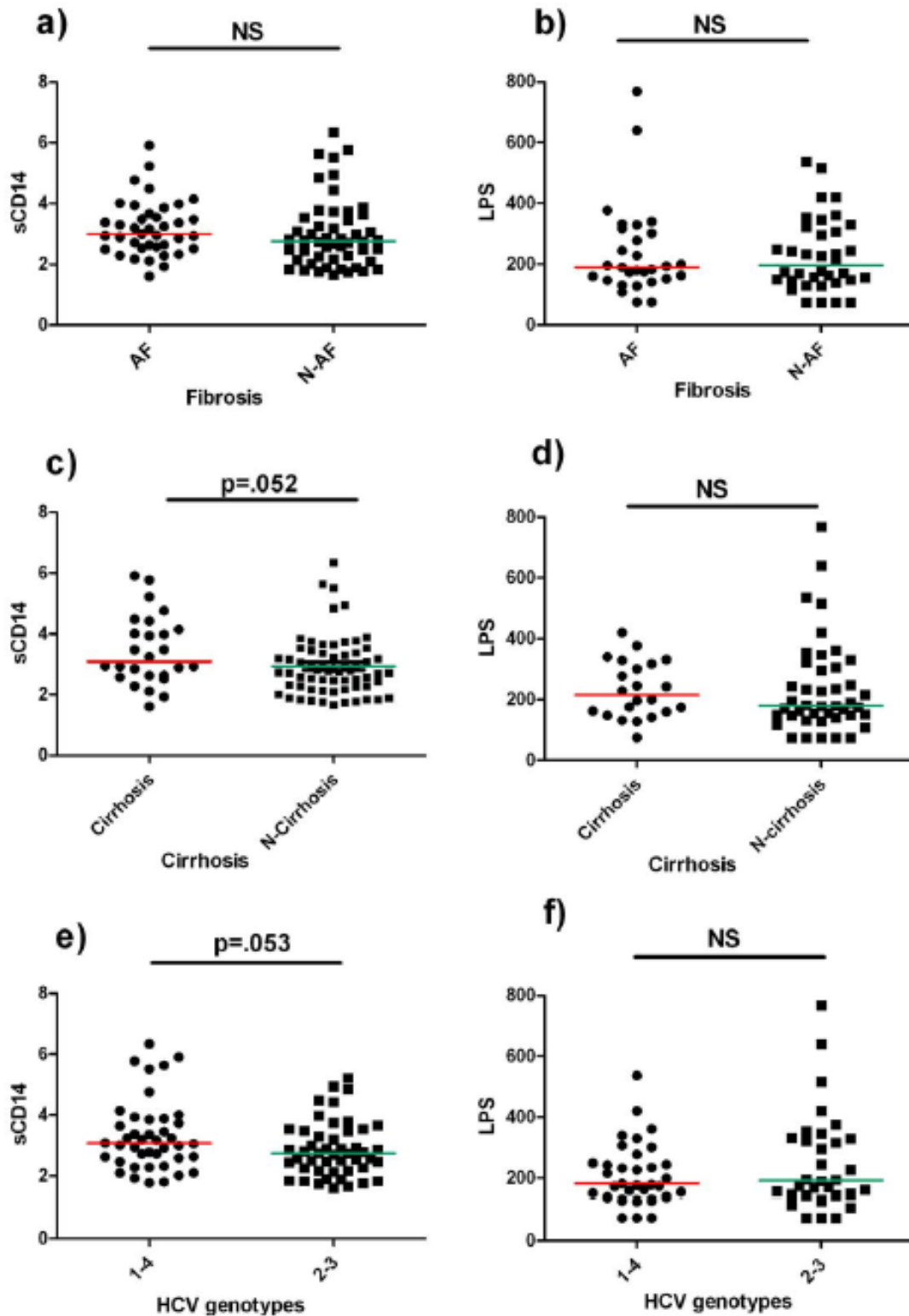
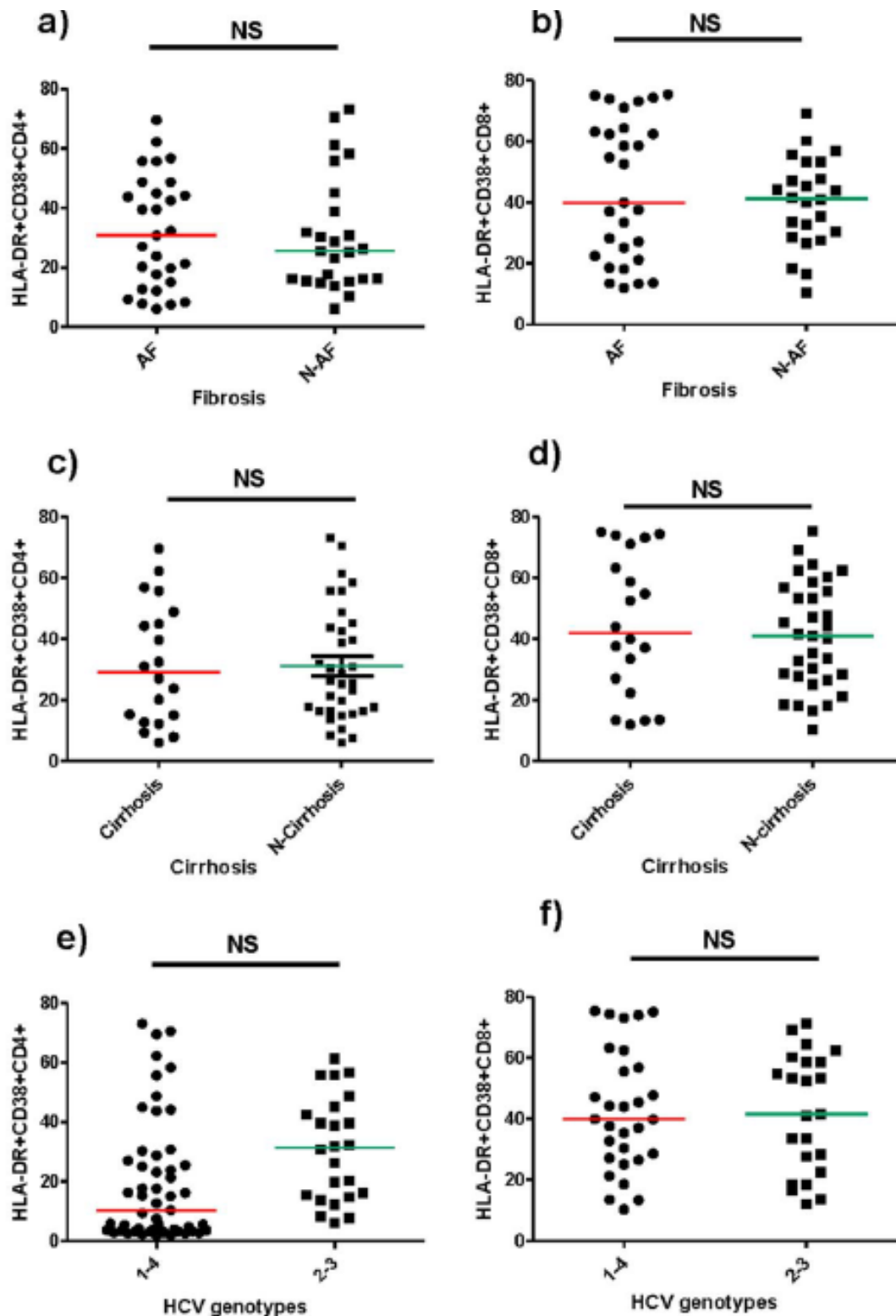


Figura 2. HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+ secondo la fibrosi epatica, cirrosi e HCV genotipo. a)-b) HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+ erano confrontate fra i pazienti con fibrosi avanzata (AF) e fibrosi non avanzata (N-AF). c)-d) HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+ erano confrontate fra pazienti con cirrosi e assenza di cirrosi (N-cirrhosis). e)-f) HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+ erano confrontate tra i pazienti con HCV genotipo 1-4 e genotipo 2-3. Ogni punto rappresenta il valore plasmatico del singolo soggetto. Sono presentati i valori % di HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+. p-value erano valutato attraverso tesi U Mann-Whitney. $p > 0.05$ era considerata non significativa (NS).



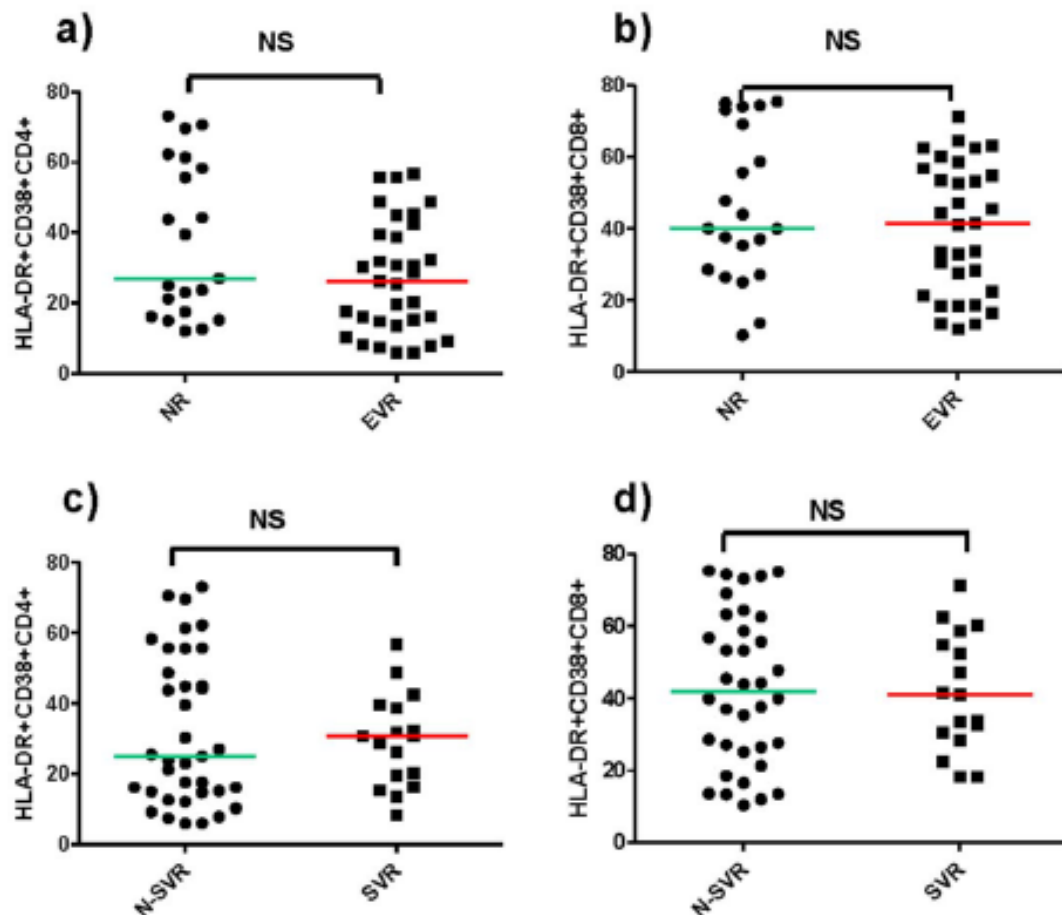
In modo simile cellule T CD4+ e CD8+ attivate era valutate in pazienti con genotipo 1-4 e genotipo 2-3 [HLA-DR+/CD38+/CD4+, genotipo 1-4: 25.26, (IQR 15.94-45.87 – genotipo 2-3: 31.34, (IQR 14.94-44.47), $p=0.986$; HLA-DR+/CD38+/CD8+, genotipo 1-4: 39.95, (IQR 26.94-58.21) – genotipo 2-3: 41.53, (IQR 22.39-58.7), $p=0.914$] (Fig.2e,f).

Immunoattivazione e TM secondo EVR al trattamento anti-HCV. Per correlare l'associazione di attivazione delle cellule T periferiche con l'*outcome* del trattamento anti-HCV con peg-IFN-alfa/ribavirina, abbiamo anche analizzato le cellule T HLA-DR+CD38+/CD4+ e CD8+ in pazienti EVR e NR.

Le mediane di HLA-DR+/CD38+/CD4+ e CD8+ erano simili in entrambi i gruppi, (HLA-DR/CD38+/CD4+, EVR 34.1 (IQR 19.3-48.3) – NR 35.4 (IQR 26-66.7), $p=0.097$; HLA-DR/CD38+/CD8+, EVR 51.2 (IQR 27.2-65.9) – NR 50.5 (IQR 35.2-76.1), $p=0.309$) (Fig.3a,b).

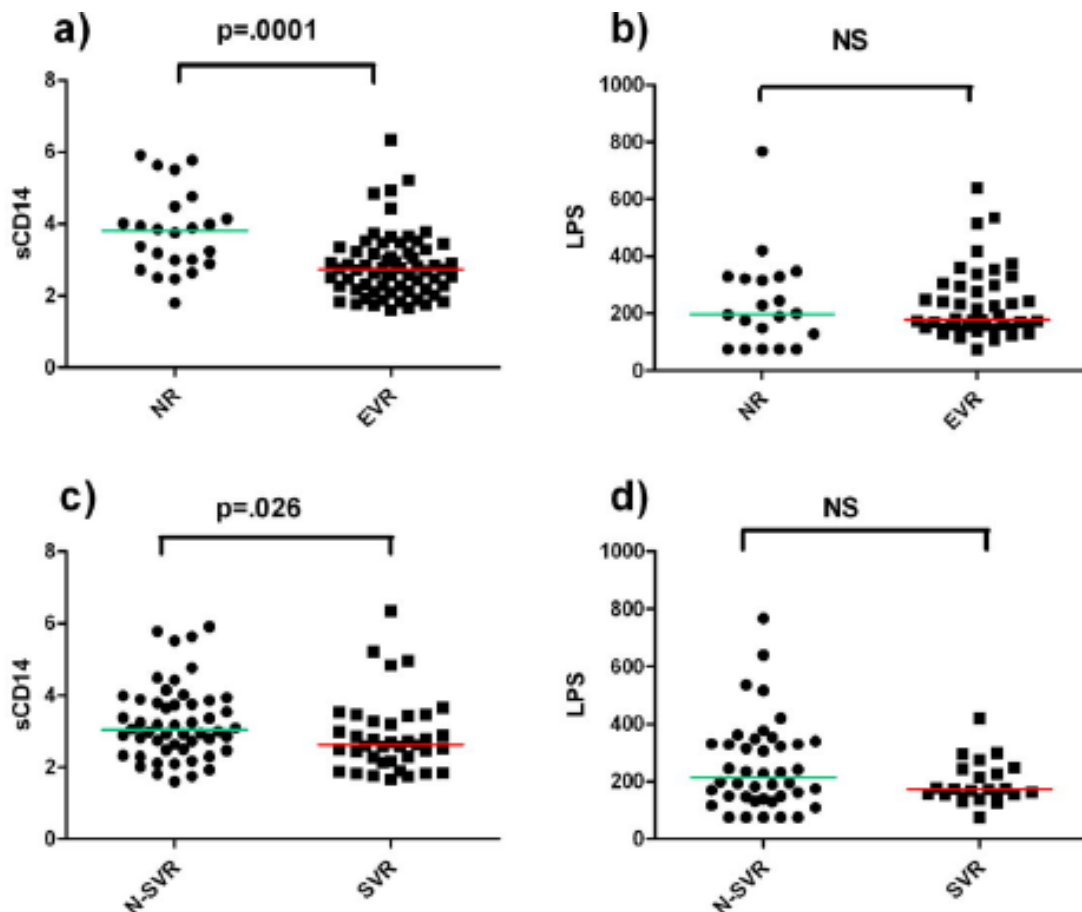
Inoltre, per valutare potenziali interazioni tra TM e risposta virologica alla terapia anti-HCV, i livelli di LPS e sCD14 al *baseline* erano confrontati tra i soggetti EVR e NR (Fig.4a,b). Interessante come i pazienti EVR hanno presentato significativamente una mediana di sCD14 più bassa (EVR 2.73, IQR: 2.18-3.25) – NR 3.8, IQR: 2.9-4.4, $p=0.0001$) (Fig.4a), nonostante non vi sia alcuna differenza nei livelli mediani di LPS fra i pazienti (EVR 178.7, IQR: 150.7-298.3 – NR 197.7, IQR: 88.4-327.4), $p=0.865$), (Fig.4b).

Figura 3. HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+ secondo EVR e SVR. a)-b) HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+ erano confrontate fra i pazienti in base a EVR e *null-responder* (NR). c)-d) HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+ erano confrontate fra pazienti in base a SVR e N-SVR. Ogni punto rappresenta il valore plasmatico del singolo soggetto. Sono presentati i valori % di HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+. p-value erano valutato attraverso tesi U Mann-Whitney. $p > 0.05$ era considerata non significativa (NS).



Identificazione di fattori associati a EVR in corso di terapia anti-HCV. Dato che la risposta dell'ospite alla TM espressa attraverso i valori di sCD14 era più bassa nei pazienti EVR al *baseline*, abbiamo indagato la sua associazione con EVR dopo aggiustamento per variabili demografiche e HCV correlate. La Tabella 2 mostra i risultati dell'analisi univariata e multivariata.

Figura 4. Livelli di sCD14 circolante e LPS sono più alti in pazienti NR e N-SVR. a)-b) sCD14 e LPS erano confrontati fra pazienti con EVR e NR. **c)-d)** sCD14 e LPS erano confrontati fra pazienti con SVR e N-SVR. Ogni punto rappresenta il valore plasmatico del singolo soggetto. Sono presentati i valori % di HLA-DR+CD4+ attivate e cellule T CD8+. p-value erano valutato attraverso tesi U Mann-Whitney. $p > 0.05$ era considerata non significativa (NS).



Nell'analisi univariata, più alti livelli di sCD14 erano associati a ridotta probabilità di raggiungere EVR (OR 0.419 per ogni unità di sCD14 in più, 95%IC 0.252-0.695, $p=0.001$), mentre non vi era associazione tra LPS ed EVR (OR 1.000 per ogni unità di LPS in più, 95%IC 0.996-1.004, $p=0.934$). Come atteso, HCV genotipo 1-4 (OR 0.109 vs HCV genotipo 2-3, 95%IC 0.037-0.324, $p=0.0001$), più alto carica virale di HCV RNA (OR 0.409 per ogni \log_{10} UI/mL in più, 95%IC 0.207-0.809, $p=0.01$), e lo stadio di cirrosi (OR 0.382 vs assenza di cirrosi, 95%IC 0.148-0.99, $p=0.048$) erano tutti associati a diminuita possibilità di EVR (Tab.2).

Tabella 2. Associazione fra marker di traslocazione microbica e EVR alla terapia anti-HCV.

	Univariate			Multivariate		
	OR	95%CI	P	AOR	95%CI	p
LPS (pg/mL)	1.000	0.996–1.004	0.934	0.997	0.99–1.004	0.345
sCD14 (µg/mL)	0.419	0.252–0.695	0.001	0.145	0.031–0.688	0.015
HCV genotypes (1–4 vs 2–3)	0.109	0.037–0.324	0.0001	0.233	0.021–2.618	0.238
HCV-RNA (log ₁₀ IU/mL)	0.409	0.207–0.809	0.01	0.789	0.134–4.628	0.793
Fibrosis (advanced vs non advanced)	0.504	0.191–1.327	0.165	0.134	0.005–3.879	0.616
Cirrhosis (yes vs no)	0.382	0.148–0.99	0.048	0.185	0.007–4.623	0.304
Nadir CD4+ T cells/µL	1.003	0.999–1.006	0.155	1.007	0.998–1.016	0.134
CD4+ T cells/µL	0.999	0.997–1.002	0.518	0.996	0.990–1.001	0.112
Age, years	1.043	0.948–1.149	0.386	1.134	0.879–1.463	0.333
Sex, male vs female	0.509	0.134–1.934	0.321	0.215	0.007–6.926	0.385

Legenda. sCD14 e LPS erano misurati in campioni plasmatici; sCD14 µg/mL, LPS pg/mL. L'analisi multivariata era stata valutata in 65/98 pazienti per cui tutti i parametri clinici, epidemiologici e biologici fossero disponibili. OR, odds ratio; AOR odds ratio aggiustato, CI, intervallo di confidenza. $p > 0.05$ era considerata non significativa.

In linea con i dati dell'univariata, la proporzione di pazienti con cirrosi erano più soggetti che fallivano l'EVR (cirrosi/NR=48%, cirrosi/EVR=26%, $p=0.044$); in modo simile una più alta proporzione di pazienti con genotipi 1-4 che non raggiungevano l'EVR (genotipi 1-4/NR=81%, genotipi 1-4/EVR=32%), $p=0.0001$). Nessuna differenza era stata evidenziata in EVR/NR in base la presenza di fibrosi ($p=0.162$).

In modo significativo, parametri predittivi nell'analisi univariata inserita nel modello di regressione logistica aggiustato per età, sesso e conta di cellule T CD4+ al *baseline* (Tab.2).

Nel complesso, l'analisi multivariata mostrata nella Tabella 2 era valutata in 65/98 pazienti per cui i dati di LPS e sCD14 era disponibili. Le caratteristiche di baseline di questi 65 soggetti sono comparabili con l'intera coorte.

In un modello aggiustato, livelli più alti di sCD14 (AOR 0.145 per ogni unità in più, 95% CI 0.031-0.688, $p=0.015$) erano confermato essere marker predittore indipendente di diminuita possibilità all'EVR (Tab.2). nessun altra variabile demografica o HCV-relata presa in esame è risultata essere indipendentemente associata a EVR (Tab.2).

Risultati simili erano stato ottenuti anche escludendo dall'analisi gli 8/98 pazienti che non avevano raggiunto 12 settimane di *follow-up* (dati non mostrati).

Caratteristiche basali della popolazione in studio in base all'SVR. I dati dell'SVR erano disponibili per 88 soggetti. Dieci pazienti non avevano raggiunto la fine dello studio al momento dell'analisi.

Nel complesso, 41 pazienti (46.6%) avevano ottenuto l'SVR. La Tabella 3 mostra i dati clinici, epidemiologici, e di laboratorio dei pazienti in studio secondo l'SVR. I pazienti che avevano ottenuto l'SVR e chi non erano confrontabili per i parametri demografici di baseline (Tab.3). Invece, anche se le cellule T CD4+ al basale erano simili, i soggetti con SVR presentavano più alti sia il nadir di CD4+ che CD8+ attuali rispetto al gruppo N-SVR (mediana, IQR: nadir cellule T CD4+ in SVR 212/ μ L, 120-268 – in N-SVR 131/ μ L, 45-198, $p=0.025$; cellule T CD8+ in SVR 693/ μ L, 558-1048.5 – N-SVR 540/ μ L, 383-952, $p=0.030$) (Tab.3).

In modo simile ai pazienti EVR, quelli SVR erano caratterizzati da una malattia di fegato al basale più lieve: infatti, confrontando con i pazienti N-SVR, essi hanno mostrato una più bassa viremia HCV mediana al *baseline* (HCV-RNA 5.3 log₁₀ cp/mL, IQR: 4.7-5.9 vs 5.68 log₁₀ cp/mL, IQR: 5.3-6.2; p=0.014) e presentavano più raramente cirrosi (9/41, 22% vs 19/44, 43%, p=0.0379. Allo stesso modo, HCV genotipi 1-4 erano più rappresentati nei pazienti N-SVR (SVR 7-17% - N-SVR 33, 70%, p=0.0001) (Tab.3).

Successivamente abbiamo valutato il valore predittivo di EVR su SVR nei nostri pazienti: il valore predittivo positivo di EVR per il raggiungimento di SVR era 64.1% (41 pazienti EVR che avevano raggiunto SVR/64 pazienti EVR che avevano raggiunto la fine dello studio), al contrario il valore predittivo negativo era 100% (tutti i 24 pazienti NR non avevano raggiunto l'SVR).

Attivazione T cellulare, TM e risposta dell'ospite alla TM secondo l'SVR al trattamento anti-HCV .

L'attivazione T linfocitaria periferica era simile in entrambi i gruppi (HLA-DR/CD38+/CD4+, SVR 30.8 (IQR 18.1-39.2) – N-SVR 25.3 (IQR 15.5-54), p=0.933; HLA-DR/CD38+/CD8+, SVR 41 (IQR 29.3-56.6) – N-SVR 40 (IQR 26.5-62.5), p=0.855) (Fig.3c,d).

Al contrario, i pazienti con SVR erano caratterizzati da più bassi livelli di sCD14 e LPS con livelli statisticamente significativi per sCD14 (mediana, IQR: sCD14 SVR 2.61, 2.14-3.33 – N-SVR 3.11, 2.49-3.97, p=0.026; LPS SVR 173.9, 151.6-243.9 – N-SVR 232.9, 148.7-330.3, p=0.164) (Fig.4c,d).

Tabella 3. Caratteristiche demografiche e immunovirologiche dei pazienti al *baseline* secondo SVR.

Characteristics	SVR (41)	N-SVR (47)	p
Age, years *	44 (40–47.5)	43 (42–46)	0.997
Gender, male °	33 (80)	40 (85)	0.565
Time since 1 st diagnosis of HIV, (years)*	18 (13–22)	18 (15–20)	0.700
Duration of HAART, (years) *	10 (5–14)	11 (9–13)	0.192
HAART °			0.849
naïve	1 (2)	1 (2)	
NNRTI+NRTI	7 (17)	5 (11)	
NRTI+PI	30 (73)	37 (79)	
other	3 (7)	4 (8)	
Exposure categories°			0.300
MSM	2 (5)	0	
WSM	2 (5)	3 (6)	
IDUs	37 (90)	44 (94)	
Previous AIDS diagnosis °	8/39 (21)	13/44 (30)	0.345
CD4+ T cells/ μ L nadir *		131 (45.2–198)	0.025
Baseline CD4+ T cells/ μ L *	467 (326.5–574)	398 (300–582)	0.281
CD4 T cells % *	26.3 (21.5–32.1)	27.5 (20–34)	0.977
CD8 T cells/ μ L *	693 (558–1048.5)	540 (383–952)	0.030
CD8 T cells % *	41.1 (35.8–49.5)	40.4 (33.6–47)	0.315
Baseline HIV-RNA log ₁₀ cp/mL *	1.7	1.7	0.934
Time to HIV-RNA <40 cp/mL (mts)*	43 (15–72)	42 (21–69)	0.986
HCV genotypes °			0.0001
1–4	7 (17)	33 (70)	
2–3	36 (88)	14 (30)	
Baseline HCV-RNA log ₁₀ IU/mL *	5.3 (4.7–5.9)	5.68 (5.3–6.2)	0.014
Cirrhosis °	9/41 (22)	19/44 (43)	0.037
Advanced fibrosis °	15/39 (38)	23/41 (56)	0.114
HBV infection (HBsAg+) °	2 (5)	4 (9)	0.681
Serum AST (U/L) *	69 (44–94.5)	69 (42–103)	0.812
Serum ALT (U/L)*	97 (56.5–170)	85 (55–127)	0.268
BMI *	22.3 (21.1–24.5)	23.1 (21.2–25.2)	0.495
Glycemia (mg/dL) *	89 (82–93)	89 (83–97.7)	0.740
Insulinemia (U/L) *	12.4 (7.1–20.3)	13.4 (9.7–21.2)	0.713
Alcohol (gr/die) *	0 (0–20)	0 (0–5)	0.611
HOMA index *	2.3 (1.5–3.8)	3.1 (1.8–4.6)	0.190

Legenda. I dati sono presentati come *mediane, (IQR) e ° numero assoluto, (%). Le differenze fra i due gruppi erano confrontate con *test U di Mann-Whitney e °test χ^2 .

Identificazione di predittori di SVR al trattamento anti-HCV. Per identificare il possibile valore predittivo di TM secondo SVR, abbiamo condotto una regressione logistica includendo variabili correlate a HIV e HCV e a entrambi LPS e sCD14 (Tab.4).

Interessante, nel modello univariato, più alti valori circolanti di sCD14 e LPS sono associati a ridotta possibilità di SVR, raggiungendo significatività per sCD14 (OR 0.668 per ogni unità in più di sCD14, 95%IC 0.428-1.041, $p=0.046$; OR 0.996 per ogni unità in più di LPS, 95%IC 0.990-1.001, $p=0.106$). In aggiunta alcuni parametri di HCV era correlati ad SVR: HCV genotipo 1-4 (OR 0.087 vs HCV genotipo 2-3, 95%IC 0.031-0.244, $p=0.0001$), viremia HCV (OR 0.423 per ogni \log_{10} UI/mL in più, 95%IC 0.224-0.798, $p=0.008$), e cirrosi (OR 0.37 vs assenza di cirrosi, 95%IC 0.143-0.957, $p=0.04$) erano predittivi per ridotta probabilità di SVR nel modello univariato.

In linea con i dati dell'univariata, la proporzione di pazienti con cirrosi era più correlata al fallimento di SVR (cirrosi/N-SVR=43%, cirrosi/SVR 22%, $p=0.037$); in modo simile una più alta proporzione di pazienti con genotipi 1-4 non raggiungeva l'SVR (genotipi 1-4/N-SVR=70%, genotipo 1-4/SVR=17%, $p=0.0001$). Nessuna differenza era evidenziata nel rapporto SVR/N-SVR in base alla presenza di fibrosi ($p=0.114$).

Successivamente abbiamo valutato un'analisi multivariata in 65/98 pazienti per i quali fossero disponibili sia LPS che sCD14 (Tab.4). Caratteristiche di *baseline* di questi 65 pazienti erano comparabili con l'intera coorte. In una regressione logistica multivariata il più importante parametro predittivo di SVR era il genotipo HCV (AOR 0.022 HCV genotipo 1-4 vs 2-3, 95%IC 0.001-

0.469, $p=0.014$). Nessun ulteriore fattore di TM e risposta immune alla TM era indipendentemente associata con SVR (Tab.4).

Tabella 4. Associazione fra marker di traslocazione microbica e SVR al trattamento anti-HCV.

	Univariate			Multivariate		
	OR	95%CI	p	AOR	95%CI	p
LPS (pg/mL)	0.996	0.990–1.001	0.106	1.000	0.980–1.003	0.129
sCD14 (pg/mL)	0.668	0.428–1.041	0.046	0.584	0.214–1.589	0.292
HCV genotypes (1–4 vs 2–3)	0.087	0.031–0.244	0.0001	0.022	0.001–0.469	0.014
HCV-RNA (log ₁₀ IU/mL)	0.423	0.224–0.798	0.008	0.778	0.309–10.231	0.519
Fibrosis (advanced vs non advanced)	0.498	0.200–1.194	0.116	0.553	0.026–11.663	0.703
Cirrhosis (yes vs no)	0.370	0.143–0.957	0.040	0.161	0.007–4.472	0.289
Nadir CD4+ T cells/ μ L	1.003	1.000–1.006	0.071	1.005	0.997–1.014	0.835
CD4+ T cells/ μ L	1.001	0.999–1.003	0.287	1.000	0.995–1.009	0.669
Age, years	0.996	0.908–1.093	0.996	0.942	0.719–1.236	0.870
Sex, male vs female	0.722	0.237–2.200	0.566	0.812	0.067–9.871	0.216

Legenda. sCD14 e LPS erano misurati su campioni di plasma; sCD14 ug/mL, LPS pg/mL. Analisi multivariata era richiesta su 65/98 pazienti per cui fossero disponibili parametri clinici, epidemiologici e biologici. OR, odds ratio; AOR, odds ratio aggiustato; CI, intervallo di confidenza.

Risultati simili erano ottenuti anche escludendo dall'analisi gli 8/98 pazienti che erano stati persi al follow-up prima delle 12 settimane (dati non mostrati).

I risultati erano simili in un'analisi di sensibilità includendo solo pazienti coinfecti HIV-HCV in HAART ($n=96$): nonostante LPS comparabile, i pazienti EVR presentavano più bassi livelli di sCD14 rispetto ai NR (mediana, IQR: sCD14 EVR 2.74, 2.18-3.26 – NR 3.75, 2.89-4.15, $p=0.0001$); LPS EVR 178.7, 150.7-298.3 – NR 195.8, 75-321.9, $p=0.649$ (Fig.S1a,b).

Pertanto, più bassi livelli di sCD14 erano esibiti nell'gruppo SVR rispetto al N-SVR (mediana, IQR: sCD14 SVR 2.63, 2.15-3.37 – N-SVR 3.06, 2.48-

3.87, $p=0.041$; LPS SVR 173.9, 151.6-243.9 – N-SVR 214.1, 145.3-329.5, $p=0.213$) (Fig.S1c,d).

Inoltre, sCD14 è stato confermato fattore associato indipendentemente a EVR (Tab S1 e S2).

Obiettivo 1b

Abbiamo considerato 43 pazienti coinfecti HIV-HCV. Tutti i pazienti hanno raggiunto T2, 41 T3, 34 T4, 23 T5. Ventotto (68.3%) erano EVR, due pazienti non avevano raggiunto le prime 12 settimane di terapia. Quindici (65.2%) aveva raggiunto SVR. Trentasei (84%) soggetti erano maschi e l'età mediana era 46 anni (IQR 41-49). Per quanto riguarda i fattori di rischio 28 (65%) erano ex-tossicodipendenti, un soggetto a trasmissione verticale e il restante 32% a trasmissione sessuale. Dal punto di vista HIV, come da criteri di inclusione i pazienti si presentavano tutti soppressi per HIVRNA e assumevano nel 79% casi terapia ART basata su uno schema comprendente un inibitore della proteasi. Ventidue (51%) soggetti erano cirrotici, definiti in base a criteri clinici, ecografici e/o istologici e 30 (70%) presentavano genotipi "difficili" 1 o 4. In 34 pazienti era stato possibile eseguire l'analisi del polimorfismo dell'IL-28 e la metà dei soggetti mostrava genotipo C/C omozigote "favorevole" per la sensibilità all'interferone. Le caratteristiche di *baseline* della popolazione in esame sono rappresentate nella Tabella 5.

Nessuna differenza è stata evidenziata al *baseline* tra i parametri demografici e quelli correlati alla coinfezione HIV-HCV (regime HAART, tempo di

infezione HIV, polimorfismo IL28, HCV genotipo e HCVRNA al basale) confrontandoli con i diversi tempi considerati.

Tabella 5. Caratterisitiche demografiche e cliniche della popolazione in studio.

Caratteristiche	Pazienti (n=43)
Età, anni (IQR)	46 (41-49)
Maschi, n (%)	36 (84)
Fattore di rischio, n (%)	
IDU	28 (65)
MSM	11 (26)
Etero	3 (9)
Tempo infezione HIV, anni (IQR)	21 (12-27)
HAART, n (%)	
PI	34 (73)
NNRTI	9 (27)
IL-28 polimorfismo, n (%)	
C/C	17 (40)
C/T	14 (32)
T/T	3 (7)
HCV genotipo, n (%)	
1	23 (54)
3	13 (30)
4	7 (16)
Cirrosi, n (%)	21 (49%)
HCVRNA baseline, log ₁₀ (IQR)	5.97 (5.36-6.38)

La mediana del numero dei linfociti T CD4+ era 487/μl (IQR 399-609), la percentuale CD4+ 28% (IQR 21-33) e il rapporto CD4+/CD8+ 0.62 (IQR 0.40-0.84) al *baseline*.

Come ci si aspettava a tutti i tempi in corso di terapia anti-HCV è stato osservato una significativa riduzione del numero dei linfociti T CD4+ (p=0.0001 a tutti i tempi), CD8+ (p=0.0001 a tutti i tempi), CD4+CD127+ (p=0.0002 al T2 e p=0.0001 al T3-T4), di CD8+CD127+ (p=0.002 al T2 e p=0.0001 al T3-T4) rispetto al *baseline*. Invece il rapporto CD4+/CD8+ aumenta in modo significativo all'EVR e all'EOT (p=0.001 e p=0.0001 rispettivamente), altro parametro che presenta a tutti i tempi un incremento significativo è CD8+CD38+% (p=0.0001 a T2, p=0.004 a T3 e p=0.0001 a T4). Nessuna differenza è stata evidenziata tra SVR e *baseline*.

Interessante come al confronto del baseline i pazienti EVR presentino un aumento significativo del parametro CD8+CD38+% rispetto ai N-EVR (EVR 3, 2-6 – NR 1, 1-4; p= 0.048), inoltre confermata al T3 (EVR 5, 3-8.5 – NR 3, 1-5; p=0.034) (Tab.6). Questa significatività non è stata vista confrontando i diversi gruppi nei vari per nessun altro parametro immunovirologico.

Nessuna correlazione è stata evidenziata confrontando il rapporto CD4+/CD8+ con i parametri di fibrosi, APRI e FIB-4, con EVR e SVR.

Tabella 6. Confronto tra immunofenotipi di linfociti T periferici tra i due gruppi EVR e N-EVR al baseline e al T3 – dopo 12 settimane dall'inizio della terapia anti-HCV.

Fenotipi immuni dei linfociti T periferici Mediana (IQR)	EVR	N-EVR	p
T0			
CD4+,%	28 (21-34)	25 (21-33)	0.866
CD8+,%	48 (40-54)	45 (36-50)	0.197
CD4+/CD8,+n	0.61 (0.39-0.88)	0.68 (0.39-0.96)	0.654
CD4+CD127+,%	16 (11-21)	13 (10-23)	0.360
CD8+CD127+,%	22 (19-28)	21 (13-28)	0.605
CD8+CD38+,%	3 (2-6)	1 (1-3)	0.048
T3			
CD4+,%	30 (24-40)	29 (23-39)	0.715
CD8+,%	45 (36-52)	40 (35-50)	0.411
CD4+/CD8,+n	0.68 (0.5-1)	0.83 (0.41-1.1)	0.987
CD4+CD127+,%	18 (11-23)	15 (12-22)	0.838
CD8+CD127+,%	21 (16-27)	20 (15-29)	0.987
CD8+CD38+,%	5 (3-8)	3 (1-5)	0.034

Obiettivo 2

Il paziente #1, maschio di 47 anni, è coinfecto HIV-HCV dal 2001 (CDC'93 A3), ex tossicodipendente con un nadir di linfociti T CD4+ 111cell/ μ L. Ha iniziato terapia antiretrovirale nel 2001 e nel momento dell'osservazione assumeva tenofovir (TDF) 245 mg, emtricitabine (FTC) 200mg, fosamprenavir/ritonavir (FPV/r) 700/100mg ogni 12 ore. Il paziente presentava una scarsa risposta immunologica (linfociti T CD4+ 224cell/ μ L) nonostante un ottimo controllo virologico (HIV RNA<40cp/mL) e un'infezione HCV genotipo 1b con un polimorfismo IL-28 C/C. Considerato il basso valore dei linfociti T CD4+, MVC è stato introdotto al dosaggio di 300mg ogni 12 ore sei mesi prima dell'inizio della terapia antivirale con PegIFN- α 2a 180 μ g/settimana e RBV 1000mg come strategia di intensificazione di terapia antiretrovirale. Il paziente ha presentato un rapido decadimento dell'HCVRNA dopo un mese di terapia nonostante l'alta carica virale iniziale fino al raggiungimento dell'SVR. MVC è stato interrotto circa un anno dopo il termine della terapia antivirale anti-HCV.

Il paziente #2 maschio di 37 anni, è HIV-positivo dal 1994 (CDC'93 A2) con un nadir di linfociti T CD4+ pari a 248/ μ L, omosessuale come fattore di rischio. Il soggetto mostrava linfociti T CD4+ 248cell/ μ L e HIVRNA <40 cp/ml in corso di terapia ART con TDF 245mg, lamivudina (3TC) 300mg, atazanavir/ritonavir (ATV/r) 300/100mg ma l'inizio della HAART risaliva al 2001. Nel 2009 era stata diagnosticata un'epatite acuta HCV-relata ma data la persistenza di HCVRNA (genotipo 1) ancora dopo 6 mesi si è deciso di intensificare la HAART con MVC e proporre al paziente la terapia anti-HCV con il classico schema PegIFN- α 2a 180 μ g/settimana e RBV 1200mg.

Maraviroc è stato iniziato 3 mesi prima della terapia antivirale e il paziente presentò un RVR ed una successiva SVR. In questo caso MVC fu interrotto al termine della terapia antivirale.

Il paziente #3 era un maschio di 50 anni, ex tossicodipendente, HIV-HCV positivo dal 1997 (CDC'93 C3) con un nadir di linfociti T CD4+ 63cell/ μ L. Questo paziente ha presentato grave immunodepressione con diagnosi di AIDS per recidivanti polmoniti batteriche per la scarsa aderenza alla HAART fino al 2006. Terapia antiretrovirale iniziata nel 1998, nel 2010 si è deciso di intensificare il trattamento con MVC in corso TDF 245mg, FTC 200mg in *fixed dose combination* (Truvada®) e darunavir/ritonavir (DRV/r) 600/100mg due volte al giorno considerando il permanere dell'immunodepressione. Il paziente che presentava inoltre una condizione epatica in peggioramento, alta viremia HCV e un genotipo 1a ma un polimorfismo IL-28 favorevole (C/C) dopo un anno e mezzo di intensificazione il paziente ha iniziato il trattamento antivirale come i precedenti soggetti presentando un decadimento di 3.5 log₁₀ al primo mese di terapia e successivamente una SVR.

Immunoricostituzione linfociti T e parametri dell'omeostasi delle cellule T CD8+. Oltre alla normale pratica clinica di follow-up e di test ematici di routine, sono stati presi in considerazione attraverso analisi citofluorimetrica conta assoluta delle cellule T CD4+ e parametri dell'omeostasi dei linfociti T CD8+. In particolare, abbiamo misurato cellule di memoria CD8+CD127+ e cellule attivate CD8+CD38+.

L'intensificazione con MVC ha contribuito a un lieve miglioramento nella conta dei linfociti T CD4+ (Fig.5), ma non ha contribuito a cambiamenti

evidenti nei parametri omeostatici delle cellule T CD8+ rispetto al periodo pre-MVC (Tab.7). Come si poteva attendere PegIFN- α e RBV hanno portato a una diminuzione nelle cellule T CD4+ circolanti per effetto della leucopenia indotta da PegIFN- α ma un successivo recupero al termine della terapia anti-HCV.

Inoltre è stata evidenziata una contrazione del *pool* di cellule di memoria centrale CD127+ e un aumento delle cellule CD38+ attivate con un trend a revertirsi al termine del trattamento antivirale anche se non completamente (Fig.6).

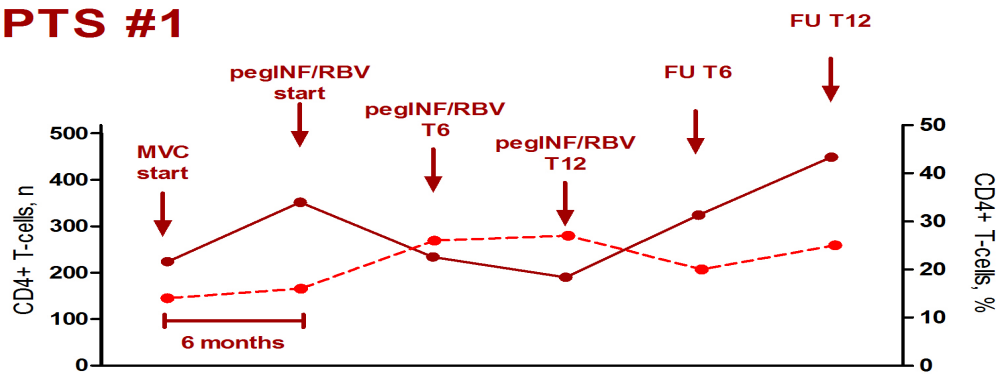
Si può inoltre notare un incremento in tutti i pazienti delle cellule T CD4+ sia in termini assoluti che di percentuale e nelle cellule CD8+ *central memory* in corso di follow-up raggiungendo valori più elevati rispetto l'era pre-intensificazione con MVC (Tab.7).

Tabella 7. Caratteristiche immunovirologiche dei 3 pazienti ai diversi time-point del trattamento anti-HCV.

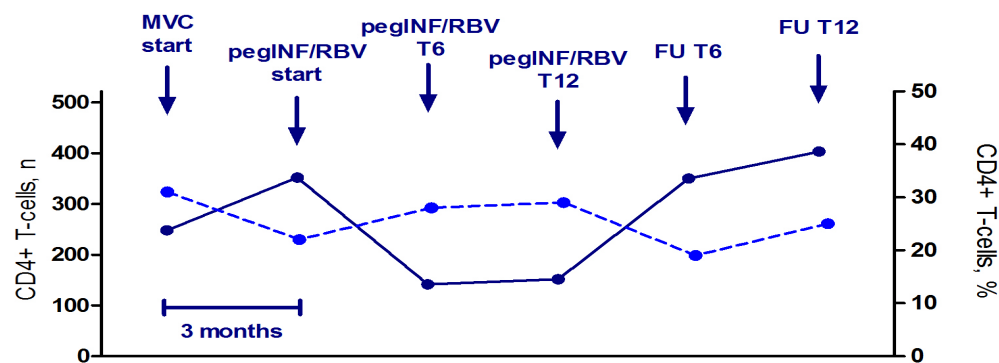
	MVC introduction			IFN-a/RBV introduction			IFN-a/RBV T6 mos			IFN-a/RBV T12 mos (end)			FU T6 mos			FU T12mos		
	Pt1	Pt2	Pt3	Pt1	Pt2	Pt3	Pt1	Pt2	Pt3	Pt1	Pt2	Pt3	Pt1	Pt2	Pt3	Pt1	Pt2	Pt3
CD4/uL	224	248	209	352	352	261	234	142	291	190	152	291	324	350	252	449	403	299
CD4%	14	31	11	16	22	11	26	28	13	27	29	14	20	19	18	25	22	11
CD8/uL	880	328	1178	1232	880	1529	486	172	1273	373	219	1199	863	1186	818	879	1107	1994
CD8%	55	41	62	56	55	67	54	35	58	52	42	56	54	65	59	50	60	73
CD4+/CD8+	0.25	0.75	0.18	0.28	0.4	0.17	0.48	0.82	0.23	0.50	0.69	0.26	0.37	0.31	0.30	0.51	0.36	0.14
CD8+CD127+(%)	21	13	15	21	10	27	16	7	38	17	11	37	24	21	38	48	30	37
CD8+CD38+(%)	1	1.5	3	1	3	4	8	6	4	12	13	7	2	9	4	3	5	7
HCVRNA UI/mL				1492354	527921	2963732	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12

Figura 5. Andamento dei linfociti T CD4+ (numero assoluto –linea intera- e % -linea tratteggiata) in corso di trattamento anti-HCV.

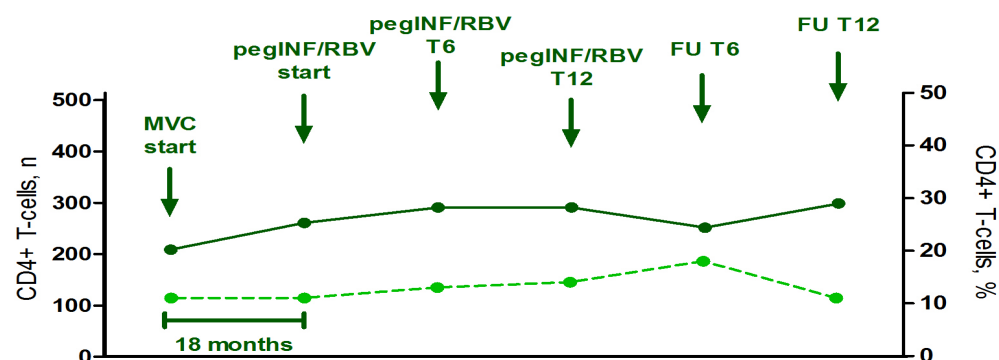
PTS #1



PTS #2

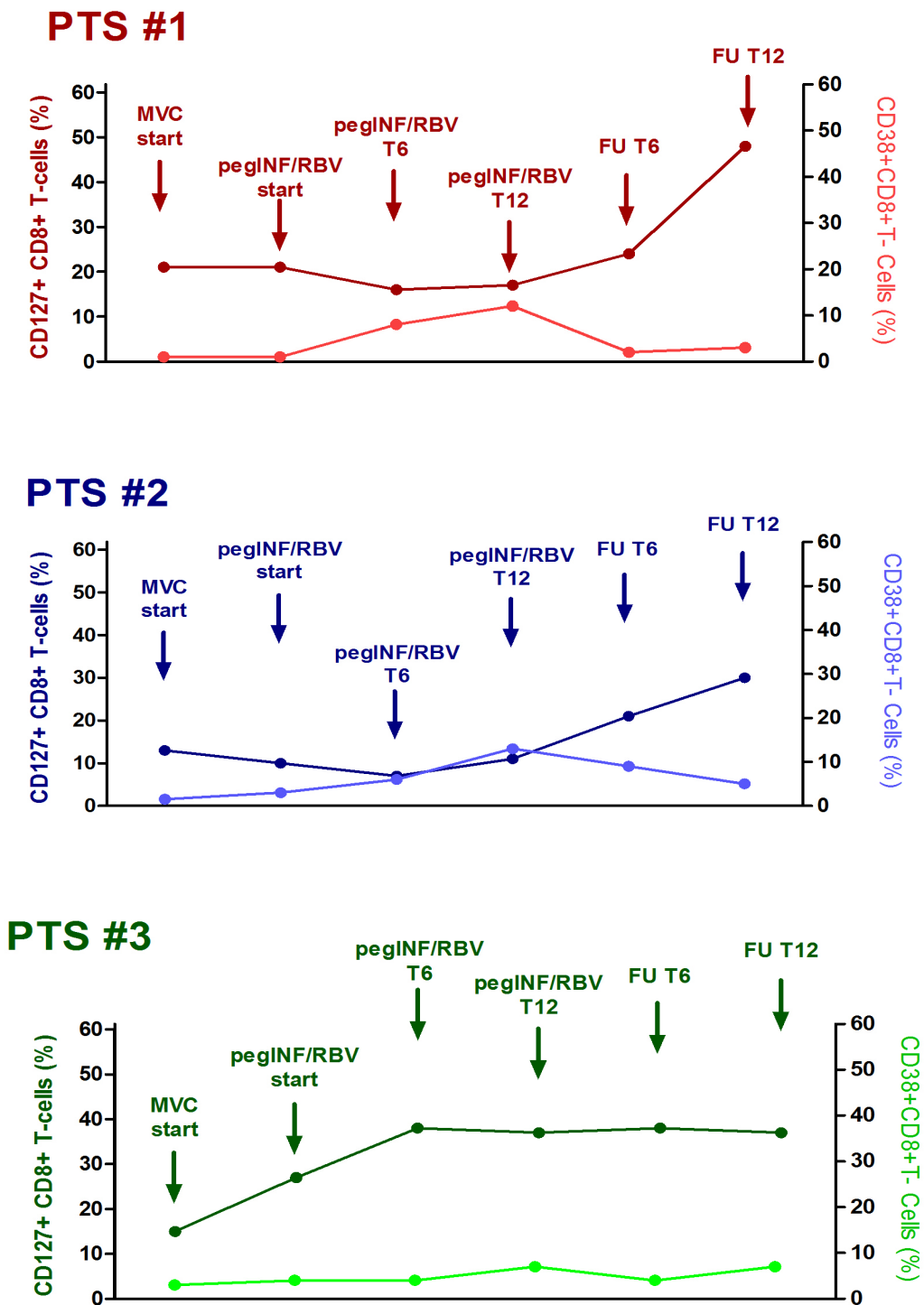


PTS #3



Legenda. MVC start=inizio della terapia con MVC; PegINF/RBV start=inizio terapia anti-HCV; PegINF/RBV T6= dopo 6 mesi inizio terapia anti-HCV; PegINF/RBV T12= termine terapia anti-HCV; FU T6= 6 mesi dopo termine terapia anti-HCV; FU T12= 12 mesi dopo termine terapia anti-HCV.

Figura 6. Andamento dei parametri di omeostasi CD8+CD127+ e CD8+CD38+ in termini di percentuale in corso di trattamento anti-HCV.



Legenda. MVC start=inizio della terapia con MVC; PegINF/RBV start=inizio terapia anti-HCV; PegINF/RBV T6= dopo 6 mesi inizio terapia anti-HCV; PegINF/RBV T12= termine terapia anti-HCV; FU T6= 6 mesi dopo termine terapia anti-HCV; FU T12= 12 mesi dopo termine terapia anti-HCV.

DISCUSSIONE

Obiettivo 1a

Nei pazienti coinfecti HIV-HCV in terapia ART si rileva: i) maggior risposta dell'ospite all'LPS in pazienti con malattia epatica HCV-relata avanzata e correlate al genotipo 1-4; ii) bassi livelli di LPS/sCD14 come predittore di risposta virologica a 3 mesi di trattamento anti-HCV (i.e. EVR).

La risposta alla terapia anti-HCV è meno soddisfacente nei soggetti coinfecti HIV-HCV, quindi utile identificare marker predittivi di *outcome* terapeutico.

C'è un'evidenza aumentata che la TM e l'immunoattivazione guidata dalla TM sono meccanismi patogenetici di malattia epatica alcool-relata [140,141], e di progressione di malattia epatica sia nei soggetti HBV e HCV monoinfecti che tanto quanto la coinfezione HIV-HCV [85,142].

Sulla stessa lunghezza d'onda di questa ipotesi i nostri dati mostrano che i pazienti coinfecti con cirrosi presentano un più alto livello di sCD14 circolante che è un marker di immunoattivazione TM-guidata [80,142].

Avendo dimostrato l'associazione fra alti livelli di sCD14 circolante e malattia epatica avanzata, successivamente ci siamo prefissati di valutare come la TM e la risposta dell'ospite possano condizionare *outcome* virologico a breve e lungo termine alla terapia anti-HCV.

I nostri risultati principali è che, nonostante ugual TM nei pazienti coinfecti HIV-HCV con e senza EVR, una risposta dell'ospite contenuta alla

traslocazione microbica attraverso misurazione di bassi valori di sCD14 circolante, predice indipendentemente EVR.

Riguardo a i fattori HCV-relati, solo il genotipo HCV è confermato legato indipendentemente alla risposta della terapia antivirale. Sebbene gli effetti dei genotipi HCV sulla patogenesi HCV-HIV, progressione di malattia e risposta alla terapia sono ancora in buona parte sconosciuti, i genotipi 1-4 sono definiti come difficili da trattare – considerando l'epoca della duplice terapia antivirale- data la più bassa possibilità di risposta ai regimi antivirali convenzionali [143,144]. In modo interessante i pazienti con genotipo 1-4 presentano elevati livelli di sCD14. Questa associazione si è mantenuta significativa anche escludendo dall'analisi i pazienti caratterizzati da grave forma di malattia epatica, suggerendo che i genotipi difficili da trattare potrebbero essere associati a più elevata immunoattivazione, possibilmente dovuta a TM.

L'immunoattivazione è stata suggerita come acceleratore della malattia epatica nei pazienti coinfecti HIV-HCV limitando perciò la risposta alla terapia [67,145,146]. Nel nostro studio, cellule T attivate HLA-DR+CD38+ erano aumentate rispetto i livelli dei pazienti monoinfecti HIV e dei soggetti sani riportati in letteratura [147], e ancora non era stata dimostrata associazione significativa con genotipi HCV, malattia epatica e risposta virologica alla terapia anti-HCV.

D'altro canto, nel mostrare un più alto livello di sCD14 nei pazienti NR, i nostri dati indicano un'aumentata attivazione di immunità innata come

possibile correlazione al fallimento della terapia, che potrebbe essere secondaria a una TM incrementata.

Comunque, TM dovrebbe essere una via rilevante nel condizionare risposta alla terapia anti-HCV attraverso il suo effetto nell'indurre eccessiva immunoattivazione, uno dovrebbe aspettarsi un'espansione parallela dei marker di attivazione cellulare e immunità innata [80-148]. Almeno due ragioni non mutualmente esclusive potrebbero spiegare questo trend discrepante nei livelli di CD8+ attivate e sCD14. Una prima considerazione è che una larga maggioranza dei nostri pazienti erano in HAART da lungo tempo e con HIVRNA soppresso, che è un noto fattore determinante di attivazione T cellulare [56]. Secondariamente, l'infezione da HCV attiva l'immunoattivazione principalmente nei monociti e macrofagi epatici, l'attivazione dei quali sostiene l'infiammazione epatica [146]. Dato il ruolo delle cellule di Kupffer nella detossificazione dei componenti batterici del circolo ematico, alti livelli di prodotti microbici nel sangue e nel fegato con effetti conseguenti possono essere uno dei meccanismi coinvolti nel controllo ridotto della replicazione virale dopo trattamento anti-HCV. Perciò, un unico fondamentale proinfiammatorio/attivato potrebbe essere ricercato nel fegato e invece non viene rilevato nel sangue periferico. Secondo questo modello, Sandler *et al.* recentemente ha descritto alta densità di CD14+CD68+ nel fegato correlato alla progressione di malattia epatica, fortemente suggestiva per l'attivazione LPS-mediata delle cellule di Kupffer epatiche [142].

I nostri dati suggeriscono che la risposta dell'ospite a una TM aumentata potrebbe giocare un ruolo centrale nella patogenesi del danno epatico correlato a HIV-HCV, e nella risposta inappropriata alla terapia, permettendo

di riflettere su un circolo vizioso, dove gli effetti HIV sulla mucosa intestinale potrebbero aumentare la TM che stimola la fibrosi epatica/cirrosi con conseguente shunt porto-sistemico, per incentivare ulteriormente la TM.

In ogni caso, quando abbiamo indagato l'effetto indipendente di TM sulla risposta a lungo termine della terapia, sCD14 era ancora associata a SVR nell'analisi univariata, ma aveva perso il valore predittivo indipendente nel modello multivariato, suggerendo che la risposta immune alla MT potrebbe giocare un ruolo nelle fasi precoci del trattamento. Visto che EVR condiziona l'SVR, questo potrebbe sottolineare l'importanza di valutare (e controllare) TM prima dell'inizio della terapia anti-HCV.

In questo studio, abbiamo analizzato solo l'sCD14 circolante come marker di attivazione dei monociti (CD163 solubile) e infiammazione sistemica (IL-6) saranno di aiuto a guadagnare una definizione dell'effetto dell'immunoattivazione/infiammazione sistemica sulla progressione della malattia epatica ed della risposta alla terapia.

Come ipotesi alternativa, sCD14 aumentato in pazienti con peggior malattia epatica e genotipo 1-4 potrebbe riflettere un incrementato interferone (IFN) endogeno piuttosto che TM aumentata. Invece, l'infezione da HCV attiva il sistema di IFN endogeno nel fegato [149]; ancora come il gene di preattivazione è associato a una mancata risposta a IFN-alfa/ribavirina, possibilmente attraverso uno stato refrattario al segnale IFN-mediato [150,151]. I pazienti portatori di HCV genotipo 1-4 hanno una più alta probabilità di fallire EVR/SVR e avere un più alto livello di IFN endogeno e dell'espressione del gene IFN-stimolato (ISG) [152,153]. Dato che

l'esposizione a IFN si è mostrata essere dovuta a macrofagi attivati con rilascio di sCD14 [154], e che i monociti CD14+ dei pazienti affetti da HIV presentano una più alta espressione di ISG [155], i dati dei pazienti cirrotici con genotipo 1-4 e non responder permettono di ipotizzare in quegli individui una netta immunoattivazione maggiore con alto IFN endogeno che risulta dal rilascio di sCD14, mentre determinano cellule meno sensibili all'IFN esogeno.

Questo studio comunque presenta dei limiti. La nostra ricerca si è focalizzata su pazienti coinfecti HIV-HCV. Dato che gli epatociti sono la maggior fonte di sCD14, un gruppo di controllo di HCV monoinfecti dovrebbe aiutare a stabilire il nesso di causa-effetto fra la risposta dell'ospite a MT e gravità di malattia epatica e risposta alla terapia nella platea di pazienti HIV-HCV coinfecti.

Tuttavia, nonostante il nostro studio non era specificatamente designato a stabilire la casualità, aggiunge al dibattito il ruolo della TM e degli effetti a valle dell'attivazione microbica nel *setting* dell'infezione da HCV e della malattia. In particolare i nostri dati incrementano le informazioni di Sandler *et al.* nei pazienti HCV monoinfecti mostrando un elevato sCD14 circolante come predittore indipendente di stadio finale di malattia epatica [83], e di Balagopal *et al.* nei pazienti coinfecti HIV-HCV correlando l'elevato rapporto sCD14/LPS con cirrosi [86], come suggeriscono un'influenza indipendente dell'immunoattivazione dovuta a MT nell'*outcome* della terapia anti-HCV.

Un ulteriore limite della nostra ricerca è che, nonostante l'associazione con EVR, l'aumento sCD14 sembrerebbe fallire nell'influenzare la risposta

sostenuta alla terapia, limitando il suo utilizzo a priori per includere o escludere i pazienti dal trattamento.

Conoscendo il fattore prognostico di EVR per SVR, sono utili studi più ampi per far luce su TM nella patogenesi della coinfezione HIV-HCV e di risposta alla terapia, essenziale premessa per valutare la possibilità di nuove strategie terapeutiche puntando sulla traslocazione dei prodotti batterici nel sangue periferico e dei suoi effetti a valle.

Obiettivo 1b

In corso di trattamento anti-HCV si è evidenziato un costante incremento del valore di immunoattivazione come da significare che la terapia interferonica possa incrementare questa condizione. Inoltre considerando i pazienti al *baseline* e a T3 e confrontando il gruppo EVR e N-EVR si vede come il parametro di immunoattivazione sia più basso nel gruppo N-EVR. Questo può significare che maggiore è l'immunoattivazione nel paziente che sta rispondendo al trattamento indipendentemente dalle variabili cliniche e virologiche HCV-relate. Questo non è stato evidenziato confrontando sempre al *baseline* a T5 nel gruppo SVR/N-SVR probabilmente per una scarsa numerosità dei campioni considerati. Il tempo T3 sembrerebbe il punto cardine della terapia duplice in base al quale potremmo valutare il successo terapeutico.

Inoltre, si è evidenziato in corso di terapia interferonica una ridistribuzione dei parametri delle cellule di memoria con una contrazione del pool sia di di CD4+CD127+ che di CD8+CD127+, non confermato al termine del

trattamento. Questo dato potrebbe essere interpretato per l'effetto di PegIFN-alfa che riduce la proliferazione e aumenta l'attivazione. Recentemente infatti è stato pubblicato un lavoro dove viene valutato come l'espressione del CD127+ predica la risposta alla terapia a base di PegIFN [156].

Nell'ambito di pazienti coinfetti HIV-HCV si è visto come il rapporto CD4+/CD8+ possa essere di aiuto a discriminare il rischio di progressione clinica di HIV in pazienti stabilmente soppressi dal punto di vista virologico [157]. Prendendo spunto da questa osservazione e come un recente articolo di *Feuth et al.* [158] ha evidenziato, si è cercata una correlazione tra fibrosi epatica e rapporto CD4+/CD8+ ed è stata vista come, nonostante un numero piccolo di pazienti maggiore è la fibrosi epatica, misurata con elastosonografia (Fibroscan), più basso è il rapporto. Nella nostra casistica non avendo l'elastonosonografia per tutti i pazienti pre-terapia abbiamo deciso di utilizzare il FIB-4 e l'APRI. Nel nostro caso nessuna correlazione è stata evidenziata ma dobbiamo sottolineare sia il numero esiguo di pazienti che la non perfetta affidabilità dei test non invasivi presi in considerazione.

Obiettivo 2

Questi dati suggeriscono che il miglioramento dei parametri omeostatici dei linfociti T indotto dall'intensificazione con MVC potrebbe avere vantaggi immunologici durante la terapia antivirale con l'interferone così da portare a termine con successo il trattamento antivirale finché i regimi *interferon-free* non verranno approvati per l'intera coorte di pazienti HCV-positivi con o senza coinfezione HIV.

In ogni caso, circa l'effetto immunologico di MVC ci sono differenti spiegazioni: il recettore CCR5 viene coinvolto nell'apoptosi, così che un antagonismo del recettore stesso potrebbe ridurre la morte cellulare programmata considerata una delle maggiori cause di perdita di cellule T CD4+ [159]; il blocco del corecettore CCR5 determina un decadimento immunoattivato con conseguente rilascio di cellule T CD4+ attraverso i reservoir [160].

Interessante come il ruolo dell'intensificazione di MVC potrebbe essere utilizzato sia per mantenere una buona risposta immunologica, soprattutto nei pazienti INR e sia per migliorare il danno epatico incrementando la possibilità di raggiungimento dell'SVR e riducendo la fibrosi epatica. L'influenza dell'inibitore del CCR5 sui cambiamenti della stiffness epatica sembrano dovuti al fatto che il recettore CCR5 è espresso sulle cellule stellate del fegato che producono materiale fibrotico e sono fortemente up-regolate in modelli sperimentali di fibrogenesi. Perciò l'utilizzo di un inibitore del CCR5 sembrerebbe ridurre la fibrosi epatica nei pazienti coinfecti HIV-HCV [Nasta et al. 2011 161] e anche il rischio di HCC valutato in un modello murino [162].

Da notare inoltre che l'incremento anche minimo visto in tutti e 3 i pazienti delle cellule CD8+CD38+ attivate in termini di percentuale con un punto massimo all'*end of treatment* per HCV sia stato visto anche in un lavoro di Massanella *et al.* [163], ma secondo questi autori non è stato correlato a nessun significato clinico anche se la rilevanza dell'up-regolazione dell'espressione del CD38+ dal punto di vista immunologico non sia ancora stata chiarita.

Ulteriore dato è stata un'espansione del pool delle cellule CD8+CD127+ in corso di terapia anti-HCV con raggiungimento di valori maggiori 12 mesi dopo il termine come fenomeno di ridistribuzione e di possibile risposta di eliminazione dell'effetto virale cronico di HCV [164].

Comunque nei 3 pazienti l'incremento dell'attivazione in corso di terapia sembra incrementare la risposta citotossica CD8+ per "clearare" il virus HCV. Inoltre tutti e tre pazienti al termine del periodo di follow-up post-trattamento antivirale hanno mostrato valori più alti di linfociti T CD4+ rispetto al basale. Infatti sembra che come risultato dell'eliminazione del virus HCV, sia stato eliminato un fattore importante di "freno" sulla risposta immunitaria. Come noto il virus HCV ha un impatto diretto sulle cellule T CD4+ nei pazienti HIV-positivi diminuendone ulteriormente la conta [67,110] ed essere un componente importante nel contesto di infezione HIV.

CONCLUSIONE

Sebbene l'arrivo in commercio dei DAA porterà man mano a un'esclusione dei regimi comprendenti PegIFN- α , al momento questa molecola rimane ancora parte integrante della nostra attuale terapia anti-HCV.

In queste pagine si è cercato di definire meglio i marker immunologici in pazienti coinfezati HIV-HCV come predittori di risposta alla terapia anti-HCV per ottimizzare il trattamento.

Le principali conclusioni di questa tesi sono:

- Nei pazienti coinfezati HIV-HCV sCD14 correla con lo stadio grave di malattia epatica e predice la precoce risposta a PegIFN- α più RBV, suggerendo l'IA guidata dalla TM come via di risposta alla terapia.
- I pazienti EVR sembrerebbero essere caratterizzati da una maggior IA suggerendo una più intensa risposta immunitaria nei confronti di HCV.
- L'infusione con Maraviroc ha determinato un lieve miglioramento della conta di linfociti T CD4⁺ e ha ridotto l'IA contribuendo a un vantaggio immunologico.

BIBLIOGRAFIA

1. Lyngstam DO. FASS: Mag-tarmsjukdomar, Leverinflammation. 2010;disponibile su: <http://www.fass.se>
2. World Health Organization/Europe; disponibile su: <http://www.euro.who.int/>
3. Lindebach BD, Rice CM. Fields Virology – Flaviviridae: The viruses and their replication, DMKaPM Howley, Editor 2007, EDS Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. p.1102-3.
4. Global Surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis prevention Board, Antwerp, Belgium. J Viral Hepat, 1999; 6:35-47.
5. Taylor LE, *et al.* HIV Coinfection With Hepatitis C Virus: Evolving Epidemiology and Treatment Paradigms. Clin Infect Dis 2012; 55:S33–42.
6. Tabor E. The natural history of hepatitis C and hepatocellular carcinoma in Viral Hepatitis. Howard C Thomas, Arie J Zuckerman, Editor 2005. p.520-3.
7. Chen SL, *et al.* The natural history of hepatitis C and virus (HCV) infection. International journal of medical sciences 2006; 3:47-52.
8. Poyard T, Benhamou Y, Thabut D, Moussali J. Progression of fibrosis in Viral Hepatitis, SLAJZ. Howard C Thomas Editor 2005. p.511-9.
9. Fattovich G, *et al.* Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. Gastroenterology 2004; 127:S35-50.

10. Choo QL, *et al.* Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989; 244:359-62.
11. The Lancet. A new direction for hepatitis C. *Lancet* 2014; 383:1270.
12. Gottwein JM, *et al.* Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type 1 and affect of antiviral drugs. *Hepatology* 2009; 49:364-77.
13. Simmonds P, *et al.* Consensus proposal for unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42:962-73.
14. Martell M, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66:3225-9.
15. Robinson M, *et al.* Preexisting drug-resistance mutations reveal unique barriers to resistance for distinct antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:10290-5.
16. Kamal SM. Genotypic Variants Around the World: is Hepatitis C virus evolving? *Curr Hep Reports* 2006; 5:142-9.
17. Morsica G, *et al.* Viral interference between hepatitis B, C and D viruses in dual and triple infections in HIV-positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51:574-81.
18. Carosi G, *et al.* OPERA: use of pegylated interferon plus ribavirin for treating hepatitis C/HIV co-infection in interferon-naive patients. *Antivir Ther* 2014; doi: 10.3851/IMP2757. [Epub ahead of print]

19. Garten RJ, *et al.* Rapid transmission of hepatitis C virus among young injecting heroin users in Southern China. *Int J Epidemiol* 2004; 33:182-8.
20. Quan VM, *et al.* Risks for HIV, HBV, and HCV infections among male injection drug users in northern Vietnam: a case-control study. *AIDS Care* 2009; 21:7-16.
21. Danta M, *et al.* Recent epidemic of acute hepatitis C virus in HIV-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *AIDS* 2007; 21:983–91.
22. Urbanus AT, *et al.* Hepatitis C virus infections among HIV-infected men who have sex with men: an expanding epidemic. *AIDS* 2009; 23:F1–7.
23. Thomas DL, *et al.* The natural history of hepatitis C virus infection : host, viral, and environmental factors. *JAMA* 2000; 284:450-6.
24. Metha SH, *et al.* Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 2002; 359:1478-83.
25. Martínez-Sierra C, *et al.* Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfectd with hepatitis C virus and HIV. *Clin Infect Dis* 2003, 36: 491-8.
26. Bica I, *et al.* Increasing mortalità due to endstage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2001; 32:492-7.
27. Mocroft A, *et al.* Changes in the cause of death among HIV positive subjects across Europe: results from the EuroSIDA Study. *AIDS* 2002, 16: 1663-71.

28. Graham CS, *et al.* Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta – analysis. Clin Infect Dis 2001; 33:562-9.
29. Bruno R, *et al.* HCV chronic hepatitis in patients with HIV: clinical management Issues. Am J Gastroenterol 2002; 97:1598-1606.
30. Eyster ME, *et al.* Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus- a multicenter hemophilia cohort study. J Acquir Immune Defic Syndr 1993; 6:602-10.
31. Sherman KE, *et al.* Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in patients with concurrent human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 1993, 31: 2679-82.
32. Cribier B, *et al.* High hepatitis C viraemia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV. AIDS 1995; 9:1131-6.
33. Soto B, *et al.* Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. J Hepatol 1997; 26:1-5.
34. Rockstroh JK, Spenger U, Sudhop T, *et al.* Immunosuppression may lead to progression of hepatitis C virus associated liver disease in hemophiliacs coinfecting with HIV. Am J Gastroenterol 1996; 91: 2563-68.
35. Woitas RP, *et al.* Antigen-specific cytokine response to hepatitis C virus core epitopes in HIV/ hepatitis C virus-coinfecting patients. AIDS 1999; 13: 1313-22.

36. Thio C, *et al.* HIV-1, Hepatitis B virus and risk of liver related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet* 2002; 360: 1921-6.
37. Benhamou Y, *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 1999; 30:1054-8.
38. Mohsen AH, *et al.* Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. *Gut* 2003; 52:1035-40.
39. Eyster ME, *et al.* Prevalence and changes in hepatitis C virus genotypes among multitransfused persons with hemophilia. The Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Infect Dis* 1999;179:1062-9.
40. Cacciola I, *et al.* Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Eng J Med* 1999; 341:22-6.
41. Nunez M. Hepatotoxicity of antiretrovirals: incidence, mechanisms and management. *J Hepatol* 2006; 44:S132-9.
42. Sanchez-Conde M, *et al.* Liver biopsy findings for HIV-infected patients with chronic hepatitis C and persistently normal levels of alanine aminotransferase. *Clin Infect Dis* 2006; 43:640-4.
43. Soriano V, *et al.* Impact of chronic liver disease due to hepatitis viruses as cause of hospital admission and death in HIV-infected drug users. *Eur J Epidemiol* 1999; 15:1-4.
44. Rosenthal E, *et al.* Mortality due to hepatitis C-related liver disease in HIV-infected patients in France (Mortavic 2001 study). *AIDS* 2003; 17:1803-9.

45. Salmon-Ceron D, *et al.* Liver disease as a major cause of death among HIV infected patients: role of hepatitis C and B viruses and alcohol. *J Hepatol* 2005; 42:799-805.
46. Brau N, *et al.* Hepatocellular carcinoma in 40 HIV/HCV coinfectd versus 50 HCV-monoinfected patients. North American HCC in HIV Study Group. In: 3rd IAS Conference on HIV pathogenesis and treatment; 24-27 July; Rio de Janeiro, Brazil, 2005.
47. Puoti M, *et al.* Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. *AIDS* 2004; 18:2285-93.
48. Benhamou Y, *et al.* Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* 2001; 34:283-7.
49. Quirishi N, *et al.* Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Lancet* 2003; 362:1708-13.
50. Marine-Barjoan E, *et al.* Impact of antiretroviral treatment on progression of hepatic fibrosis in HIV/hepatitis C virus co-infected patients. *AIDS* 2004, 18: 2163-70.
51. Sulkowski MS, *et al.* Hepatitis C Virus as an opportunistic disease in persons infected with immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2000, 30: S77-84.
52. Kramer JR, *et al.* Hepatitis C coinfection increases the risk of fulminant hepatic failure in patients with HIV in the HAART era. *J Hepatol* 2005, 42:309-14.

53. Sulkowski MS, *et al.* Hepatotoxicity associated with nevirapine or efavirenz containing antiretroviral therapy: role of hepatitis C and B infections. *Hepatology* 2002, 35:182-9.
54. Martinez E, *et al.* Hepatotoxicity in HIV-1-infected patients receiving nevirapine-containing antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15:1261-8.
55. Mallewa JE, *et al.* HIV-associated lipodystrophy: a review of underlying mechanisms and therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:648-60.
56. Deeks SG, *et al.* Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* , 2004; 104:942–7.
57. Hunt PW. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2012; 9:139-47.
58. Lane HC, *et al.* Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1983; 309:453-8.
59. Hellerstein M, *et al.* Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 1999; 5:83-9.
60. Valdez H, Lederman MM. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev* 1997:187–228.
61. Douek DC, *et al.* 2009. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 2009; 60:471-84.
62. Grossman Z, *et al.* Multiple modes of cellular activation and virus transmission in HIV infection: a role for chronically and latently

- infected cells in sustaining viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:6314-9.
63. Giorgi JV, *et al.* Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179:859-70.
 64. Hunt PW, *et al.* Relationship between T cell activation and CD4₊T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIVRNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 2008; 197:126-33.
 65. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS* 2008; 22:439-46.
 66. Paiardini M, *et al.* Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD4⁺ T cells are associated with limited ccr5 expression. *Nat Med* 2011; 17:830-6.
 67. Gonzalez VD, *et al.* High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. *J Virol* 2009; 83:11407-11.
 68. Kovacs A, *et al.* CD8⁺ T cell activation in women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2008; 197:1402-7.

69. Wolochow H, *et al.* Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J Infect Dis* 1966; 116:523-8.
70. Fuller R, *et al.* Resistance of the fowl (*Gallus domesticus*) to invasion by its intestinal flora. I. The effect of hormonal bursectomy on the invasiveness of the intestinal microflora of the fowl. *Res Vet Sci* 1970; 11:363-7.
71. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 1995; 3:149-54.
72. Alexander JW, *et al.* Distribution and survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. *Ann Surg* 1991; 213:558-66; discussion 566– 567.
73. Tancrède CH, Andremont AO. Bacterial translocation and gramnegative bacteremia in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis* 1985; 152:99-103.
74. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:20-6.
75. Caradonna L, *et al.* Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 2000 6:205–214.
76. Cooke KR, *et al.* LPS antagonism reduces graft-versushost disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001; 107:1581-9.

77. Schietroma M, *et al.* Intestinal permeability and systemic endotoxemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. *Ann Surg* 2006; 243:359 –363.
78. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:13-9.
79. Mattapallil JJ, *et al.* Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005; 434: 1093-7.
80. Brenchley JM, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12:1365-71.
81. Marchetti G, *et al.* Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral naive patients with high CD4+ cell count. *AIDS* 2011; 25:1385-94.
82. Jiang W, *et al.* Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis* 2009; 199:1177-85.
83. Sandler NG, *et al.* Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 2011; 141:1220–1230, 1230.e1221–1223.
84. Dolganiuc A, *et al.* Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology* 2007; 133: 1627–1636.

85. Caradonna L, *et al.* Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection. *Curr Pharm Des* 2002; 8:995-1005.
86. Balagopal A, *et al.* Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C. *Gastroenterology* 2008; 135: 226-33.
87. Marchetti G, *et al.* Immune activation and microbial translocation in liver disease progression in HIV/hepatitis co-infected patients: results from the ICONA Foundation study. *BMC Infect Dis* 2014; 14:79.
88. Ge D, *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461:399–401.
89. Rauch A, *et al.* Swiss Hepatitis C Cohort Study, Swiss HIV Cohort Study. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138:1338-45.
90. Suppiah V, *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41:1100-4.
91. Tanaka Y, *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41:1105-9.
92. Lohse N, *et al.* Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995–2005. *Ann Intern Med* 2007; 146:87–95.

93. Bhaskaran K, *et al.* Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. JAMA 2008; 300: 51-9.
94. Zwahlen M, *et al.* Mortality of HIV-infected patients starting potent antiretroviral therapy: comparison with the general population in nine industrialized countries. Int J Epidemiol 2009; 38:1624-33.
95. Guaraldi G, *et al.* Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. Clin Infect Dis 2011; 53:1120-6.
96. Deeks SG, *et al.* Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. Immunity 2013; 39:633-45.
97. Young J, *et al.* CD4 cell count and the risk of AIDS or death in HIV-Infected adults on combination antiretroviral therapy with a suppressed viral load: a longitudinal cohort study from COHERE. PLoS Med 2012; 9:e1001194.
98. Margolick JB, *et al.* Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. The Multicenter AIDS Cohort Study. Nat Med 1995; 1:674-80.
99. Devitt E, *et al.* CD4 but not CD4:CD8 ratio recovery after 14 years successful HIV suppression [Abstract 311]. In: Proceedings of the 20th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections; 3–6 March 2013; Atlanta, Georgia, United States. CROI 2013.
100. Hadrup SR, *et al.* Longitudinal Studies of Clonally Expanded CD8 T Cells Reveal a Repertoire Shrinkage Predicting Mortality and an

Increased Number of Dysfunctional Cytomegalovirus-Specific T Cells in the Very Elderly. *J Immunol* 2006; 176:2645-53.

101. Ferguson FG, *et al.* Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: B378-82.
102. Margolick JBJ, *et al.* Impact of inversion of the CD4/CD8 ratio on the natural history of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42: 620-6.
103. Torti C, *et al.* Factors influencing the normalization of CD4+ T-cell count, percentage and CD4+/CD8+ T-cell ratio in HIV-infected patients on long-term suppressive antiretroviral therapy. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:449-58.
104. Serrano-Villar S, *et al.* The CD4/CD8 ratio in HIV-infected subjects is independently associated with T-cell activation despite long-term viral suppression. *J Infect* 2013, 66:57-6.
105. Sainz T, *et al.* The CD4/CD8 Ratio as a Marker T-cell Activation, Senescence and Activation/Exhaustion in Treated HIV-Infected Children and Young Adults. *AIDS* 2013; 27:1513-6.
106. Serrano-Villar S, *et al.* The CD4:CD8 ratio is associated with markers of age-associated disease in virally suppressed HIV-infected patients with immunological recovery. *HIV Med* 2014; 15:40-9.

107. Lo J, *et al.* Increased prevalence of subclinical coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS* 2010; 24:243-53.
108. Serrano-Villar S, *et al.* Increased Risk of Serious Non-AIDS-Related Events in HIV-Infected Subjects on Antiretroviral Therapy Associated with a Low CD4/CD8 Ratio. *PLoS One* 2014; 9: e85798.
109. Serrano-Villar S, *et al.* HIV-Infected Individuals with Low CD4/CD8 Ratio despite Effective Antiretroviral Therapy Exhibit Altered T Cell Subsets, Heightened CD8+ T Cell Activation, and Increased Risk of Non-AIDS Morbidity and Mortality. *Plos Path* 2014; 10:e1004078.
110. Sajadi MM, *et al.* Chronic immune activation and decreased CD4 counts associated with Hepatitis C Infection in HIV-1 Natural Viral Suppressors. *AIDS* 2012; 26:1879-84.
111. Weber R, *et al.* Decreasing mortality and changing patterns of causes of death in the Swiss HIV Cohort Study. *HIV Med* 2013; 14:195-207.
112. Tan R, *et al.* Clinical outcome of HIV-infected antiretroviral-naive patients with discordant immunologic virologic responses to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 47:553-8.
113. Robbins GK, *et al.* Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin Infect Dis* 2009; 48:350–61.

114. Renaud M, *et al.* Determinants of paradoxical CD4 cell reconstitution after protease inhibitor-containing antiretroviral regimen. *AIDS* 1999; 13:669-76.
115. HIV Surrogate Marker Collaborative Group. Human immunodeficiency virus type 1 RNA level and CD4 count as prognostic markers and surrogate end points: a metaanalysis. HIV Surrogate Marker Collaborative Group. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:1123–33.
116. d'Arminio Monforte A, *et al.* CD4+ cell counts at the third month of HAART may predict clinical failure. *AIDS* 1999; 13:1669–76.
117. Zoufaly A, *et al.* Clinical Outcome of HIV-Infected Patients with Discordant Virological and Immunological Response to Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 2010; 203:364-71.
118. EACS: Guidelines version 7.0. October 2013. Downloaded from <http://www.eacsociety.org>
119. DHHS: Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Downloaded from <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines> on 18/11/2014
120. Rossi R, *et al.* In vitro effect of anti-human immunodeficiency virus CCR5 antagonist MVC on chemotactic activity of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2011;166:184-90.
121. Wilkin TJ, *et al.* A pilot trial of adding maraviroc to suppressive antiretroviral therapy for suboptimal CD4+ T-cell recovery despite

- sustained virologic suppression: ACTG A5256. J Infect Dis 2012;206:534-42.
122. Chung RT, *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. N Engl J Med 2004; 351:451-9.
123. Laguno M, *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of HIV/HCV co-infected patients. AIDS 2004; 18:F27-36.
124. Gao BF, *et al.* Host Factors and failure of interferon-alpha treatment in hepatitis C virus. Hepatology 2004; 39:880-90.
125. Zeuzem S, *et al.* Telaprevir for retreatment of HCV infection. N Eng J Med 2011, 364:2417-28
126. Jacobson IM, *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. N Eng J Med 2011, 364:2405-16.
127. Poordad F, *et al.* Boceprevir for previously untreated chronic HCV genotype 1 infection. N Eng J Med 2011; 364:1195-206.
128. Vierling J, *et al.* Efficacy of boceprevir in prior null responders to Peginterferon/ribavirin: the PROVIDE Study. 62th Annual Meeting of the AASLD. San Francisco 2011 Nov 6-9.
129. Bacon BR, *et al.* Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. N Eng J Med 2011; 364:1207-17.
130. Feld JJ and Hoofnagle. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. Nature 2005; 436:967-72.

131. Hultgren C, *et al.* The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998;79: 2381-91.
132. Mann MP, *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358:958-65.
133. Fried MW. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology* 2002;36:237-44.
134. Fried MW, *et al.* Rapid virological response is the most important predictor of sustained virological response across genotypes in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2010.
135. Davis GL, *et al.* Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:645-52.
136. Di Bisceglie AM, *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and hepatitis C viral kinetics during antiviral therapy: the null responder. *J Med Virol* 2006; 78:446-51.
137. Castera L, *et al.* Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; 48:835-47.
138. Wai CT, *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:518-26.
139. Vallet-Pichard A, *et al.* FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection, comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007; 46:32-6.

140. Thurman RG. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 275:605-11.
141. Enomoto N, et al. Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells. *Hepatology* 1999; 29:1680–9.
142. Sandler NG, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 2011; 141: 1220–1230, 1230.e1221–3.
143. Farnik H, et al. Optimal therapy in genotype 1 patients. *Liver Int* 2009; 29: 23-30.
144. Kamal SM. Hepatitis C genotype 4 therapy: increasing options and improving outcomes. *Liver Int* 2009; 29:39-48.
145. Kovacs A, et al. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfectd with hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2010; 201: 823-34.
146. Gonzalez VD, et al. Innate immunity and chronic immune activation in HCV/HIV-1 co-infection. *Clin Immunol* 2010; 135:12-25.
147. Hunt PW, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003; 187:1534–43.
148. Funderburg N, et al. Tolllike receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS One* 2008; 3:e1915.

149. Thomas DL, *et al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461:798–801.
150. Sarasin-Filipowicz M, *et al.* Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7034-9.
151. Sarasin-Filipowicz M, *et al.* Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4841-51.
152. Dill MT, *et al.* Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140:1021-31.
153. Urban TJ, *et al.* IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 52:1888-96.
154. Brettschneider J, *et al.* The macrophage activity marker sCD14 is increased in patients with multiple sclerosis and upregulated by interferon beta-1b. *J Neuroimmunol* 2002; 133:193-7.
155. Rempel H, *et al.* Interferon-alpha drives monocyte gene expression in chronic unsuppressed HIV-1 infection. *AIDS* 2010; 24:1415-23.
156. Kared H, *et al.* CD127 expression, exhaustion status and antigen specific proliferation predict sustained virological response to IFN in HIV/HCV co-infected individuals. *Plos One* 2014; 9:e101144.
157. Serrano-Villar S, *et al.* HIV-Infected Individuals with Low CD4/CD8 Ratio despite Effective Antiretroviral Therapy Exhibit Altered T Cell

- Subsets, Heightened CD8+ T Cell Activation, and Increased Risk of Non-AIDS Morbidity and Mortality. *Plos Pathog* 2014; 10:e1004078.
158. Feuth T, *et al.* CD4/CD8 ratio is a promising candidate for non-invasive measurement of liver fibrosis in chronic HCV-monoinfected patients *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33:1113–7.
159. Corbeau P, Reynes J. CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects. *AIDS*. 2009; 23:1931–43.
160. Silvestri G, Paiardini M, Pandrea I, *et al.* Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *J Clin Invest* 2007; 117:3148-54.
161. Nasta P, *et al.* Liver stiffness (LS) change in HIV-hepatitis C (HCV) coinfectd patients treated with CCR5 inhibitor based antiretroviral therapy. 51st ICAAC. Abs H3-810.
162. Ochoa-Callejero L, *et al.* Maraviroc, a CCR5 Antagonist, Prevents Development of Hepatocellular Carcinoma in a Mouse Model. *PLoS ONE* 2013; 8:e53992.
163. Massanella M, *et al.* Changes in T-cell subsets in HIV-HCV-coinfectd patients during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. *Antivir Ther* 2010; 15:333-42.
164. Badr G, *et al.* Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8 memory T cells. *J Virol* 2008, 82:10017-31.